

## Short peptides which selectively modulate the activity of serine/threonine kinases

**Patent number:** JP2002500649T

**Publication date:** 2002-01-08

**Inventor:**

**Applicant:**

**Classification:**

**- international:** **C12N9/12**; A61K38/00; **C12N9/12**; A61K38/00; (IPC1-7): C07K7/06; A61K38/45; A61P1/00; A61P3/04; A61P3/10; A61P7/00; A61P7/02; A61P9/04; A61P9/10; A61P9/12; A61P11/06; A61P13/12; A61P17/06; A61P25/00; A61P25/16; A61P25/28; A61P29/00; A61P35/00; A61P37/04; A61P37/06; A61P43/00; C07K7/08; C12N9/12; C12Q1/48

**- european:** C12N9/12B1; C12N9/12B1B

**Application number:** JP19980550580T 19980520

**Priority number(s):** US19970861338 19970521; WO1998US10319 19980520

**Also published as:**



WO9853050 (A3)  
WO9853050 (A2)  
EP0983346 (A3)  
EP0983346 (A2)  
US6174993 (B1)

more >>

**Report a data error here**

Abstract not available for JP2002500649T

Abstract of correspondent: **US6174993**

Disclosed are peptides which are peptide derivatives of the HJ loop of a serine/threonine kinase. The peptides can modulate the activity of the serine/threonine kinase. Also disclosed are methods of modulating the activity of a serine/threonine kinase in a subject by administering one of the peptides of the present invention.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-500649  
(P2002-500649A)

(43) 公表日 平成14年1月8日(2002.1.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
C 0 7 K 7/06	Z N A	C 0 7 K 7/06	Z N A
A 6 1 K 38/45		A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/00		3/04	
3/04		3/10	
3/10		7/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-550580  
(86) (22) 出願日 平成10年5月20日(1998.5.20)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年11月19日(1999.11.19)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 0 3 1 9  
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 5 3 0 5 0  
(87) 国際公開日 平成10年11月26日(1998.11.26)  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 8 6 1 , 3 3 8  
(32) 優先日 平成9年5月21日(1997.5.21)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ザ チルドレンズ メディカル センター  
コーポレーション  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02115 ボストン, ロングウッド ストリ  
ート 300  
(71) 出願人 イッサム リサーチ ディベロップメント  
カンパニー オブ ザ ヒーブルー ユ  
ニバーシティー オブ エルサレム  
イスラエル国 エルサレム 91042 ビー.  
オー. ボックス 4279, ジャボティンスカ  
イ ストリート 46  
(74) 代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セリン／トレオニンキナーゼの活性を選択的に調節するショートペプチド

(57) 【要約】

セリン／トレオニンキナーゼのH Jループのペプチド誘導体であるペプチドが開示される。該ペプチドは、セリン／トレオニンキナーゼの活性を調節することができる。また、本発明のペプチドのうちの1つを投与することにより、被験体中のセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する方法が開示される。

**【特許請求の範囲】**

1. セリン／トレオニンキナーゼのH Jループのペプチド誘導体を含有するペプチドであって、
  - a) 該ペプチドが約5個～約20個のアミノ酸またはアミノ酸類似体を有し、並びに
  - b) 該ペプチドがセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する、ペプチド。
2. ペプチドが環状である請求項1記載のペプチド。
3. ペプチドが直鎖状である請求項1記載のペプチド。
4. ペプチドのN末端及びC末端が置換されていない請求項3記載のペプチド。
5. N末端またはC末端の少なくとも1つが置換されている請求項3記載のペプチド。
6. N末端がアミド化され、C末端がアシル化されている請求項5記載のペプチド。
7. ペプチド誘導体が該セリン／トレオニンキナーゼの該H Jループのアミノ酸配列の任意のサブ配列に対応するアミノ酸配列を有する請求項3記載のペプチド（ただし、ペプチド誘導体の配列中の任意の1個のアミノ酸は変化して、いかなるアミノ酸またはその類似体にもなり得る）。
8. セリン／トレオニンキナーゼがp o l o、R a f、有糸分裂活性化プロテインキナーゼ（MAPキナーゼ）およびGタンパク質共役型受容体キナーゼからなるファミリーの群から選ばれる、セリン／トレオニンキナーゼファミリーのメンバーである請求項3記載のペプチド。
9. セリン／トレオニンキナーゼが、プロテインキナーゼC、サイクリックAMP依存性キナーゼ、カルモジュリン依存性キナーゼ、サイクリックGMP依存性プロテインキナーゼ、A k t／P K BおよびG S K 3からなる群より選ばれる、請求項3記載のペプチド。
10. セリン／トレオニンキナーゼがp o l oファミリーのメンバーであり、P l k、S n kおよびS a kからなる群より選ばれる、請求項8記載のペプチド

。

11. セリン／トレオニンキナーゼがRafファミリー由来であり、Raf-1、A-RafおよびB-Rafからなる群より選ばれる、請求項8記載のペプチド。

12. セリン／トレオニンキナーゼが $\beta$ 2-アドレナリン受容体キナーゼ、ロドプシンキナーゼおよびGRK4～6からなる群より選ばれたGタンパク質依存性キナーゼである、請求項8記載のペプチド。

13. ペプチド誘導体が該HJループのアミノ酸配列のサブ配列に対応するアミノ酸配列を有する、請求項3記載のペプチド。

14. ペプチドがHJ-38（配列番号：13）、J-41（配列番号：14）、

J-42（配列番号：15）、J-43（配列番号：16）、J-43.1（配列番号：17）、J-45（配列番号：18）、J-46（配列番号：19）、J-47（配列番号：20）、J-48（配列番号：21）またはJ-29（配列番号：22）の配列を有する、請求項3記載のペプチド。

15. HJ-38（配列番号：13）、J-41（配列番号：14）、J-42（配列番号：15）、J-43（配列番号：16\_\_）、J-43.1（配列番号：17）、J-45（配列番号：18）、J-46（配列番号：19）、J-47（配列番号：20）、J-48（配列番号：21）またはJ-29（配列番号：22）の配列を有するペプチド（ただし、そのペプチド中の任意の1個のアミノ酸残基は変化し、自然に存在するアミノ酸またはその類似体となり得る）。

16. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

（ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はアラニン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はアラニン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はヒスチジン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>13</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステ

ル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアルギニン、N-アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジ

ノブタン酸からなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる)。

17. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がRafのHJループの配列(配列番号：1)またはそのサブ配列に対応する、請求項16記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

18. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がRafのHJループの配列またはそのサブ配列(配列番号：1)に対応する、請求項16記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

19. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より

選ばれる請求項18または20記載のペプチド。

20. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はアラニンまたはグリシンである；

AA<sub>5</sub>はアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はプロリンである；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>13</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラ

ギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はプロリンである；

AA<sub>16</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる）。

21. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がサイクリックAMP依存性キナーゼのHJループの配列（配列番号：2）またはそのサブ配列に対応する、請求項20記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ

酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

22. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がサイクリックAMP依存性キナーゼのHJループの配列またはそのサブ配列（配列番号：2）に対応する、請求項20記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

23. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サ



ブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項21または22記載のペプチド。

24. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はシステイン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はプロリン、アラニンおよびセリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エス

テルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>13</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグ

ルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>は、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はヒスチジングルタミン酸およびグルタミン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香

族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる)。

25. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がプロテインキナーゼCのHJループの配列(配列番号:3)またはそのサブ配列に対応する、請求項24記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

26. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がプロテインキナーゼCのHJループの配列またはそのサブ配列(配列番号:3)に対応する、請求項24記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

27. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サ

ブ配列がAA<sub>3</sub>~AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>~AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>~AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項25または26記載のペプチド。

28. アミノ酸AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジノブタン酸からなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はヒスチジンである；

AA<sub>8</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアルギニン、アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジノブタン酸からなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステ

ル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>13</sub>はヒスチジンである；

AA<sub>14</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>15</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>16</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>17</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>19</sub>はヒスチジンである；ならびに

AA<sub>20</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる)。

29. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がbARK1.2のHJループの配列(配列番号:4)またはそのサブ配列に対応する、請求項28記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

30. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がbARK1.2のHJループ

の配列またはそのサブ配列（配列番号：4）に対応する、請求項28記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

31. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項29または30記載のペプチド。

32. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

（ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はシステイン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、N-アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジノブタン酸(2-amino-4-guanidinobutanoic)からなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選

ばれる；

AA<sub>11</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はアスパラギンまたはグルタミンである；

AA<sub>13</sub>はアルパラギンまたはグルタミンである；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸および脂肪族酸、置換された脂肪族酸、芳香族酸、置換された芳香族酸、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸のベンジルエステルまたは置換されたベンジルエステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はリジン、オルニチンおよびヒスチジンからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸および脂肪族酸、置換された脂肪族酸、芳香族酸、置換された芳香族酸、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸のベンジルエステルまたは置換されたベンジルエステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、N-アミジノシトルリン、2-アミノ-4-グアニジノブタン酸、リジンおよびオルニチンからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>20</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸および脂肪族酸、置換された脂肪族酸、芳香族酸、置換された芳香族酸、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸のベンジルエステルまたは置換されたベンジルエステルからなる群より選ばれる)。

33. 配列AA<sub>1</sub>AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がAkt/PKBのHJループの配列(配列番号: 7)またはそのサブ配列に対応する、請求項32記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配

列は変化し得る)。

34. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がAkt/PKBのHJループの配列またはそのサブ配列(配列番号: 7)に対応する、請求項32記載のペプ

チド（ただし、配列A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

35. ペプチドが配列A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がA A<sub>3</sub>～A A<sub>10</sub>、A A<sub>7</sub>～A A<sub>14</sub>およびA A<sub>11</sub>～A A<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項33または34記載のペプチド。

36. アミノ酸A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

（ここで、A A<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

A A<sub>2</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A A<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A A<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A A<sub>5</sub>はグルタミン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A A<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

A A<sub>7</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

A A<sub>8</sub>はプロリンである；

A A<sub>9</sub>はプロリンである；

A A<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

A A<sub>11</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

A A<sub>12</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステ

ル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>13</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はヒスチジンである；

AA<sub>17</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアルギニン、アミジノシトルリン、2-アミノ-4-グアニジノブタン酸リジンおよびオルニチンからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はリジン、オルニチン、ロイシン、イリロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる)。

37. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がカルモジュリン依存性キナーゼのHJループの配列(配列番号:5)またはそのサブ配列に対応する、請求項



36記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

38. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がカルモジュリン依存性キナーゼのHJループの配列またはそのサブ配列（配列番号：5）に対応する、請求項36記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

39. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項37または38記載のペプチド。

40. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

（ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる

群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はセリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、アミジノシトルリン、2-アミノ-4-グアニジノブタン酸リジンおよびオルニチンからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はプロリンである；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>13</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>14</sub>はシステイン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>17</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる)。

41. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がp.o.l.o.のHJループの配列(配列番号：6)またはそのサブ配列に対応する、請求項40記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

42. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がp.o.l.o.のHJループの配列またはそのサブ配列(配列番号：6)に対応する、請求項40記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

43. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サ

ブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項41または42記載のペプチド。

44. アミノ酸残基AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸残基を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、AA<sub>1</sub>はアラニンまたはグリシンである；

AA<sub>2</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸またはグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルである；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

AA<sub>5</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はアスパラギンまたはグルタミンである；

AA<sub>8</sub>はプロリンである；

AA<sub>9</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンである；

AA<sub>11</sub>はプロリンである；

AA<sub>12</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>13</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸またはアスパラギン酸若しくはグルタミン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルである；

AA<sub>14</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>15</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>16</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

AA<sub>17</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸またはグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換

されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルである；

AA<sub>18</sub>はアスパラギンまたはグルタミンである；

AA<sub>19</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；ならびに  
AA<sub>20</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである）。

45. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がGSK3のHJループの配列（配列番号：12）またはそのサブ配列に対応する、請求項44記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変換し得る）。

46. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がGSK3のHJループの配列またはそのサブ配列（配列番号：12）に対応する、請求項44記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変換し得る）。

47. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項45または46記載のペプチド。

48. 下記工程：

a) セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体を含み、約5個～約20個のアミノ酸またはその類似体を有する、「試験ペプチド」と呼ばれるペプチドを提供する工程；

b) セリン／トレオニンキナーゼの活性を評価するのに好適な条件下でそのセリン／トレオニンキナーゼにより制御される1以上の細胞活性を有する細胞と試験ペプチドをインキュベートする工程；

c) セリン／トレオニンキナーゼの活性を評価する工程、ここで、試験ペプチドをインキュベートせずに培養した細胞と比較した場合により高いまたはより低い活性が見られることは、該ペプチドがセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節することを示す、を含む、セリン／トレオニンキナーゼの活性を調節するペプチ

ドを同定する方法。

49. セリン／トレオニンキナーゼの活性が組織培養中の該細胞の生存率または増殖率を測定することで評価される、請求項48記載の方法。

50. 治療有効量の、セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体を含むペプチドを投与する工程を含み、

a) 該ペプチドが約5個～約20個のアミノ酸またはアミノ酸類似体を有し；および

b) 該ペプチドがセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する、被験体中のセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する方法。

### 【発明の詳細な説明】

セリン／トレオニンキナーゼの活性を選択的に調節するショートペプチド

#### 関連出願

本願は、1997年5月21日に出願された米国特許出願番号第08/861,338号の一部継続出願であり、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 発明の背景

セリン／トレオニンキナーゼは、真核生物のタンパク質キナーゼスーパーファミリーの1つのメンバーである。このクラスの酵素は、細胞内タンパク質のセリンまたはトレオニン残基を特異的にリン酸化し、そして多細胞器官へのシグナル伝達を媒介する点で重要である。多くのセリン／トレオニンキナーゼは、核へのシグナル伝達および他のタンパク質の活性化を含む、細胞内へのシグナル伝達において役割を果たす細胞内タンパク質として存在する。他のセリン／トレオニンキナーゼ（例えば、Gタンパク質共役型受容体キナーゼ）が、細胞膜中に見出されており、そして膜内外シグナル伝達に関与している。

このように、セリン／トレオニンキナーゼによるセリンまたはトレオニンのリン酸化は、環境変化に応答する細胞内事象を調節するための重要な機構である。広範な種々の細胞性の事象が、セリン／トレオニンキナーゼによって調節されている。いくつかの例として、有糸分裂、細胞増殖、細胞分化、脂質代謝の制御、免疫応答、炎症性応答、ならびにグリコーゲンの代謝の制御を始めるおよび／または完了する細胞の能力が挙げられる。

従って、セリン／トレオニンキナーゼの活性を調節（増大または低下）し得る試薬は、広範な種々の疾患および状態（例えば、ガン、肥満症、自己免疫障害、炎症、およびII型糖尿病）の治療に大きな可能性を有する。

#### 発明の要約

セリン／トレオニンキナーゼのHJループの誘導体であるショートペプチドが、セリン／トレオニンキナーゼを発現する細胞の活性化に有意に影響を与え得ることが、現在、見出されている（「HJループ」は、本明細書中で以下に定義されている）。例えば、RafおよびPoloのHJループのペプチド誘導体は、ウシの大動脈

の細胞ならびに形質転換されたマウスの細胞株MS1および／またはSVR細胞の増殖を、インビトロにおいて10 $\mu$ M程度の低い濃度で阻害する（実施例2）。上記の発見に基づいて、セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体である新規のペプチドが本明細書中で開示される。セリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する該セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体を同定する方法もまた、開示される。被験体中のセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する方法もまた、開示される。

本発明の1つの実施態様は、セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体である新規のペプチドである。このペプチドは、約5個から約20個の間のアミノ酸残基またはアミノ酸残基類似体を含み、そしてセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する。ペプチドのN末端および／またはC末端は、置換され得るか、または置換されなくてもよい。ペプチドは、直鎖状または環状であり得る。

本発明の別の実施態様は、被験体中のセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する方法である。この方法は、上記のように、治療有効量の、セリン／トレオニンキナーゼのHJループの誘導体であるペプチドを投与する工程を包含する。

本発明のなお別の実施態様は、セリン／トレオニンキナーゼの活性を調節するペプチドを同定する方法である。この方法は、約5個～約20個のアミノ酸またはアミノ酸類似体を有し、そして上記のセリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体である、「試験ペプチド」を提供する工程を包含する。試験ペプ

チドは、セリン／トレオニンキナーゼの活性を評価するために好適な条件下で、該セリン／トレオニンキナーゼの制御下の細胞の活性または機能を有する細胞とともにインキュベートされる。セリン／トレオニンキナーゼの活性が評価され、そして試験ペプチドの非存在下で同じ条件下で増殖させた同じ細胞型の細胞と比較される。試験ペプチドの非存在下で増殖させた細胞と比較してより高い活性またはより低い活性は、試験ペプチドがセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節することを示す。

本発明のペプチドは、STKの過剰な反応性および異常な不活性によって引き起

こされる広範な種々の疾患の治療において使用され得る。例として、ガン、糖尿病、肥満症、中枢神経系の疾患、炎症性障害、自己免疫疾患、および心臓血管系の疾患が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のペプチドはまた、インビトロでの有用性、例えば、ペプチドが由来するセリン／トレオニンキナーゼに特異的に結合する抗体の生成において有用性を有する。これらの抗体は、セリン／トレオニンキナーゼを発現する細胞を同定するため、およびセリン／トレオニンキナーゼの細胞内分布を研究するために使用され得る。さらに、本発明のペプチドは、ペプチドが由来するセリン／トレオニンキナーゼのHJループに結合するリガンドを同定および定量するために使用され得る。

#### 図面の簡単な説明

図1は、セリン／トレオニンキナーゼのファミリーの間で見出されるHJループのアミノ酸1からアミノ酸10までについてのコンセンサス配列を示す配列である。

図2は、HJループサイクリックAMP依存性プロテインキナーゼおよびプロテインキナーゼCの、アミノ酸1からアミノ酸20までについてのコンセンサス配列を示す配列である。

図3は、以下のアミノ酸配列を示す表である：セリン／トレオニンキナーゼRA

FのHJループ(配列番号:1)、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ(CAPK)のHJループ(配列番号:2)、プロテインキナーゼC(PKC)のHJループ(配列番号:3)、G受容体共役型プロテインキナーゼ $\beta$ 2-アトルナリン受容体キナーゼ1および2(bARK1.2)のHJループ(配列番号:4)、カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMK)のHJループ(配列番号:5)、poloキナーゼのHJループ(配列番号:6)、Akt/PKB(配列番号:7)およびGタンパク質共役型受容体キナーゼGRK1のHJループ(配列番号:8)、GRK4のHJループ(配列番号:9)、GRK5のHJループ(配列番号:10)、GRK6のHJループ(配列番号:11)ならびにGSK3のHJループ(配列番号:12)。これらのアミノ酸配列における同類置換の例もまた、示される。「\*」は、グルタミン酸またはアスパラギン酸の、脂肪族、置換された脂肪族、ベンジル、置換されたベンジル、芳香族、または置換された芳香族エステルを示す。



図4は、ペプチドHJ-38（配列番号:13）、J-41（配列番号:14）、J-42（配列番号:15）、J-43（配列番号:16）、J-43.1（配列番号:17）、J-45（配列番号:18）、J-46（配列番号:19）、J-47（配列番号:20）、J-48（配列番号:21）、およびJ-29（配列番号:22）の配列を示す表である。全てのペプチドは、N-アセチル化されており、そしてC-アミド化されている。「E!」は、グルタミン酸のベンジルエステルを示す。

図5は、コントロールと比較した、漸増濃度（ $\mu$ M）のK048H101（配列番号:24）の存在下での胎児の肺繊維芽細胞中のコラーゲン産生の阻害パーセントを示すグラフである。K048H101は、セリン／トレオニンキナーゼALK1のHJループのペプチド誘導体である。

図6は、本発明の例示的なペプチド誘導体の配列、およびこれらのHJループに由来するセリン／トレオニンキナーゼの配列を示す表である。図6に示されるペプチド誘導体は、K095H101（配列番号:23）；K048H101（配列番号:24）；K098H101（配列番号:25）；K099H101（配列番号:26）；K093H101（配列番号:27）；K014H101（配列番号:28）；K004H001（配列番号:29）；K004H002（配列番号:30）；K049H101（配列番号:31）；K050H101（配列番号:32）；K088H001（配列番号:33）；K088H101（配列番号:34）；K088H103（配列番号:35）；K088H104（配列番号:36）；K092H001（配列番号:37）；K018H101（配列番号:38）；K087H001（配列番号:39）；K087H101（配列番号:40）；K087H102（配列番号:41）；K087H103（配列番号:42）；K090H101（配列番号:43）；K091H001（配列番号:44）；K091H101（配列番号:45）；K107H001（配列番号:46）；K107H101（配列番号:47）；K107H102（配列番号:48）；K045H101（配列番号:49）；K045H102（配列番号:50）；K008H001（配列番号:51）；K008H101（配列番号:52）；K008H102（配列番号:53）；K008H103（配列番号:54）；K035H001（配列番号:55）；K035H101（配列番号:56）；K038H101（配列番号:57）；K038H102（配列番号:58）；K003H103（配列番号:59）；K003H104（配列番号:60）；K001H102（配列番号:61）；およびK001H103（配列番号:62）である。

#### 発明の詳細な説明

セリン／トレオニンキナーゼ（以下、「STK」）は、セリンまたはトレオニン残基の水酸基上にリン酸モノエステルを生成するために、ATPまたはGTPの $\gamma$ リン

酸を使用する、細胞内タンパク質または膜結合タンパク質である。STKは、このリン酸化を行う、相同な「キナーゼドメイン」または「触媒ドメイン」を有する。多数のプロテインキナーゼの比較に基づいて、STKを含むプロテインキナーゼのキナーゼドメインを12個のサブドメインに分けることができることが、現在公知であり、これらは一般的には、大きなアミノ酸の挿入によって中断されておらず、そして保存残基の特徴的なパターンを含む領域である (HanksおよびHunter、「真核生物のプロテインキナーゼスーパーファミリー(The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily)」HardieおよびHanks (編)、The Protein Kinase Facts Book、第1巻、Academic Press、第2章、1995年)。これらのサブドメインは、サブドメインIからサブドメインXIIと呼ばれている。

本明細書中で言及される「HJループ」は、サブドメインIXの中間からサブドメインXの中間の間の、STKのキナーゼドメイン中に見出される。STKを含む種々のプロテインキナーゼのサブドメイン中に見出される高い程度の相同性に起因して、種々のSTKのドメインのアミノ酸配列を整列させることができる。従って、STKのHJループは、原型のプロテインキナーゼ (例えば、PKA-C  $\alpha$ ) のアミノ酸配列を参照して定義することができ、そしてPKA-C  $\alpha$  のおよそアミノ酸229から248までの間に見出される約20個のアミノ酸残基の隣接(contiguous)配列に対応すると言うことができる。

上記の段落において提供される定義に対して補足的なSTKのHJループの第2の定義は、STKのキナーゼドメインの三次元構造を参照して行われ得る。STKのキナーゼドメインは、ヘリックスAからヘリックスIと呼ばれる、少なくとも9個の $\alpha$ ヘリックスを含むことが見出されている (Taborら、Phil. Trans. R. Soc. Lond. B340 : 315(1993)、Mohammadiら、Cell 86 : 577(1996)およびHubbardら、Nature 372 : 746(1994))。HJループは、約20個のアミノ酸の隣接配列であり、これは、Fヘリックス内のFヘリックスのN末端から約5番目のアミノ酸残基から開始し、そしてGヘリックス中の約5番目のアミノ酸残基まで伸びている。

必要に応じて、本発明のペプチドのC末端またはN末端、あるいはその両方が、それぞれ、カルボン酸保護基またはアミン保護基で置換され得る。好適な保護

基は、GreenおよびWuts、「有機合成における保護基 (Protecting Groups in Organic Synthesis)」, John Wiley & Sons、第5章および第7章、1991年に記載されており、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。好ましい保護基は、例えば、ペプチドの親水性を減少させそして脂肪親和性を増大させることによって、細胞内へのペプチドの輸送を促進する基である。N末端保護基の例として、アシル基 ( $-CO-R_1$ )、およびアルコキシカルボニル基またはアリールオキシカルボニル基 ( $-CO-O-R_1$ ) が挙げられる。ここで、 $R_1$ は、脂肪族基、置換され

た脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、芳香族基、または置換された芳香族基である。アシル基の特異的な例として、アセチル、(エチル)  $-CO-$ 、 $n$ -プロピル  $-CO-$ 、イソ-プロピル  $-CO-$ 、 $n$ -ブチル  $-CO-$ 、 $sec$ -ブチル  $-CO-$ 、 $t$ -ブチル  $-CO-$ 、フェニル  $-CO-$ 、置換されたフェニル  $-CO-$ 、ベンジル  $-CO-$ 、および(置換されたベンジル)  $-CO-$ が挙げられる。アルコキシカルボニル基およびアリールオキシカルボニル基の例として、 $CH_3-O-CO-$ 、(エチル)  $-O-CO-$ 、 $n$ -プロピル  $-O-CO-$ 、イソ-プロピル  $-O-CO-$ 、 $n$ -ブチル  $-O-CO-$ 、 $sec$ -ブチル  $-O-CO-$ 、 $t$ -ブチル  $-O-CO-$ 、フェニル  $-O-CO-$ 、置換されたフェニル  $-O-CO-$ 、およびベンジル  $-O-CO-$ 、(置換されたベンジル)  $-O-CO-$ が挙げられる。C末端のカルボキシル基は、例えば、アミド(すなわち、C末端の水酸基が  $-NH_2$ 、 $-NHR_2$ 、および  $-NR_2R_3$  で置き換えられる)またはエステル(すなわち、C末端の水酸基が、 $-OR_2$  で置き換えられる)として、保護され得る。 $R_2$ および $R_3$ は、独立して、脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、アリール基、または置換されたアリール基である。さらに、窒素原子とともに、 $R_2$ および $R_3$ は、窒素、酸素、またはイオウのような約0~2個のさらなるヘテロ原子を有する、C4~C8のヘテロ環式環を形成し得る。好適なヘテロ環式環の例として、ピペリジニル、ピロリジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、またはピペラジニルが挙げられる。C末端保護基の例として、 $-NH_2$ 、 $-NHCH_3$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NH$ (エチル)、 $-N$ (エチル) $_2$ 、 $-N$ (メチル)(エチル)、 $-NH$ (ベンジル)、 $-N$ (C1~C4アルキル)(ベンジル)、 $-NH$ (フェニル)、 $-N$ (C1~C4アルキル)(フェニル)、 $-OCH_3$ 、 $-O-$ (エチル)、 $-O-$ ( $n$ -プロピル)、 $-O-$ ( $n$ -ブチル)、 $-O-$ (イソ-プロピル)、 $-O-$ ( $sec$ -ブチル)、 $-O-$ ( $t$ -ブチル)、 $-O-$ ベン

ジル、および-O-フェニルが挙げられる。

「HJループのペプチド誘導体」には、HJループのアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。「HJループのペプチド誘導体」にはまた、例えば、STKのHJループのサブ配列が含まれる。サブ配列は、大きな配列中に見出される、約5個～約20個のアミノ酸またはアミノ酸残基の隣接配列である。従って、HJループのサブ

配列は、HJループ中に見出される、約5個～約20個のアミノ酸またはアミノ酸残基の隣接配列である。HJループのサブ配列はまた、HJループの「フラグメント」とも呼ばれ得る。

「ペプチド誘導体」にはまた、元の配列またはサブ配列中の1つ以上のアミノ酸が、自然に存在するアミノ酸またはアミノ酸類似体で置換されている、「改変された配列」（「改変されたアミノ酸」とも呼ばれる）を有するペプチドが含まれる。本発明の1つの局面において、ペプチド誘導体は、STKのHJループのサブ配列に対応する配列を有する。ただし、ペプチド誘導体中の任意の1つのアミノ酸残基は、サブ配列中の対応するアミノ酸残基とは異なり得る。例えば、サブ配列が $[AA_1]-[AA_2]-AA_3-[AA_4]-[AA_5]$ である場合、ペプチド誘導体は、 $[AA_1']-[AA_2]-[AA_3]-[AA_4]-[AA_5]$ 、 $[AA_1]-[AA_2']-[AA_3]-[AA_4]-[AA_5]$ 、 $[AA_1]-[AA_2]-[AA_3']-[AA_4]-[AA_5]$ 、 $[AA_1]-[AA_2]-[AA_3]-[AA_4']-[AA_5]$ 、および $[AA_1]-[AA_2]-AA_3-[AA_4]-[AA_5']$ である。ここで、 $[AA']$ は、 $[AA]$ とは異なる、自然に存在するアミノ酸または改変されたアミノ酸である。本発明の別の局面において、ペプチド誘導体は、STKのHJループのサブ配列に対応する配列を有する。ただし、ペプチド誘導体中の任意の2つのアミノ酸残基は、サブ配列中の対応するアミノ酸残基とは異なってもよい。

「アミノ酸残基」は、ペプチド中に見出される部分であり、そして $-NH-CHR-CO-$ によって示される。ここで、Rは、自然に存在するアミノ酸の側鎖である。ペプチド中に見出される部分について言及する場合、「アミノ酸残基」および「アミノ酸」という用語は、本願において互換的に使用される。「アミノ酸残基類似体」には、以下の式： $-NH-CHR-CO-$ を有するDまたはL残基が含まれる。ここで、Rは、脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、芳香

族基、または置換された芳香族基であり、そしてここでRは、自然に存在するアミノ酸の側鎖には対応しない。ペプチド中に見出される部分について言及する場合、「アミノ酸残基類似体」および「アミノ酸類似体」という用語は、本願

において互換的に使用される。

本明細書中で使用される場合、脂肪族基には、完全に飽和されている、直鎖状、分枝状、または環状のC1～C8炭化水素が含まれる。これは、窒素、酸素、またはイオウのような1つまたは2つのヘテロ原子を含み、そして／あるいは不飽和である1つ以上のユニットを含む。芳香族基には、フェニルおよびナフチルのような炭素環式芳香族基、ならびにイミダゾール、インドリル、チエニル、フラニル、ピリジル、ピラニル、ピラニル、オキサゾリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、キノリニル、イソキノリニル、およびアクリジニル (acridintyl) のようなヘテロ環式芳香族基が含まれる。

脂肪族基、芳香族基、またはベンジル基についての好適な置換基として、-OH、ハロゲン (-Br、-Cl、-I、および-F)、-O (脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、アリール基、または置換されたアリール基)、-CN、-NO<sub>2</sub>、-COOH、-NH<sub>2</sub>、-NH (脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、アリール基、または置換されたアリール基)、-N (脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、アリール基、または置換されたアリール基)<sub>2</sub>、-COO (脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、アリール基、または置換されたアリール基)、-CONH<sub>2</sub>、-CONH (脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、アリール基、または置換されたアリール基)、-SH、-S (脂肪族基、置換された脂肪族基、ベンジル基、置換されたベンジル基、芳香族基、または置換された芳香族基)、および-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>が挙げられる。置換されたベンジル基または芳香族基はまた、置換基として脂肪族基または置換された脂肪族基を有し得る。置換された脂肪族基はまた、置換基として、ベンジル基、置換されたベンジル基、アリール基、または置換されたアリール基を有し得る。置換された脂肪族基、置換された芳香族基、または置換されたベンジル基は、1つ以上の置換基を有し

得る。

HJループの配列またはHJループのサブ配列中のアミノ酸残基についての好適な置換として、STKの活性を調節するペプチド誘導体を生じる同類置換が挙げられる。「同類置換」は、置換するアミノ酸（自然に存在するかまたは改変された）が、置換されるアミノ酸とほぼ同じ大きさおよび電気的特性を有する置換である。従って、置換するアミノ酸は、元のアミノ酸と同じまたは類似の官能基を、側鎖中に有する。

「同類置換」はまた、側鎖中の官能基が好適な保護基でより機能的にされることを除いて、置換されるアミノ酸と同一である置換するアミノ酸を利用することをも言う。好適な保護基は、GreenおよびWuts、「有機合成における保護基 (Protecting Groups in Organic Synthesis)」、John Wiley & Sons、第5章および第7章、1991年に記載されており、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。N末端およびC末端保護基を用いる際に、好ましい保護基は、例えば、ペプチドの親水性を低下させ、そして脂肪親和性を増大させることによって細胞内へのペプチドの輸送を促進し、そして細胞の内部で、インビボで加水分解または酵素的分解のいずれかによって切断され得る基である。(Ditterら、J. Pharm. Sci. 57: 783(1968); Ditterら、J. Pharm. Sci. 57: 828(1968); Ditterら、J. Pharm. Sci. 58: 557(1969); Kingら、Biochemistry 26: 2294(1987); Lindbergら、Drug Metabolism and Disposition 17: 311(1989); およびTunekら、Biochem. Pharm. 37: 3867(1988)、Andersonら、Arch. Biochem. Biophys. 239: 538(1985)、およびSinghalら、FASEB J. 1: 220(1987))。ヒドロキシル保護基として、エステル、炭酸エステル、およびカルバミン酸エステル保護基が挙げられる。アミン保護基として、N末端保護基についての上記のような、アルコキシカルボニル基およびアリールオキシカルボニル基が挙げられる。カルボン酸保護基として、C末端保護基についての上記のような、脂肪族エステル、ベンジルエステル、およびアリールエステル(esters esters)が挙げられる。1つの実施態様において、本発明のペプチド中の1つ以上のグルタミン酸残基

またはアスパラギン酸残基の側鎖中のカルボン酸基は、好ましくは、メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル、または置換されたベンジルエステルで、より好ましくはベンジルエステルで保護される。

グループの中の各アミノ酸が類似の電気的および立体的特性を有する、自然に存在するアミノ酸および改変されたアミノ酸のグループを以下に提供する。従って、同類置換は、アミノ酸を同じグループに由来する別のアミノ酸で置換することによって行われ得る。これらのグループは限定的ではないこと、すなわち、各グループに含まれ得るさらに改変されたアミノ酸が存在することが、理解されるべきである。

グループIには、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、セリン、システイン、トレオニン、および以下の側鎖を有する改変されたアミノ酸が含まれる：エチル、*n*-ブチル、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ 、および $-\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 。好ましくは、グループIとして、ロイシン、イソロイシン、バリン、およびメチオニンが挙げられる。

グループIIには、グリシン、アラニン、バリン、セリン、システイン、トレオニン、およびエチル側鎖を有する改変されたアミノ酸が含まれる。好ましくは、グループIIとして、グリシンおよびアラニンが挙げられる。

グループIIIには、フェニルアラニン、フェニルグリシン、チロシン、トリプトファン、シクロヘキシルメチル、および置換されたベンジルまたはフェニル側鎖を有する改変されたアミノ残基が含まれる。好ましくは、置換基は、以下の1つ以上の基を含む：ハロゲン、メチル、エチル、ニトロ、メトキシ、エトキシ、および $-\text{CN}$ 。好ましくは、グループIIIとして、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンが挙げられる。

グループIVには、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸またはアスパラギン酸の置換されたまたは置換されていない脂肪族エステル、芳香族エステル、またはベンジルエステル（例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソ-プロピル、シクロヘキシル、ベンジル、または置換されたベンジル）、グルタミン、アスパラギン、 $\text{CO-NH}$ -アルキル化グルタミンまたはアスパラギン（例えば、メチル

、エチル、*n*-プロピル、およびイソ-プロピル) および側鎖-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOHを有する改変されたアミノ酸、それらのエステル(置換されたまたは置換されていない脂肪族エステル、芳香族エステル、またはベンジルエステル)、それらのアミド、およびそれらの置換されたまたは置換されていない*N*-アルキル化アミドが含まれる。好ましくは、グループIVとして、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン酸メチル、アスパラギン酸エチル、アスパラギン酸ベンジル、ならびにグルタミン酸メチル、グルタミン酸エチル、およびグルタミン酸ベンジルが挙げられる。

グループVには、ヒスチジン、リジン、アルギニン、*N*-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアルギニン、*N*-アミジノシトルリン、および2-アミノ-4-グアニジノブタン酸、リジンの同族体、アルギニンおよびオルニチンの同族体が含まれる。好ましくは、グループVとして、ヒスチジン、リジン、アルギニン、およびオルニチンが挙げられる。アミノ酸の同族体には、側鎖中に1個~約3個のさらなるメチレンユニットが含まれる。

グループVIには、セリン、トレオニン、システイン、および-OHまたは-SHで置換されたC1~C5の直鎖状または分枝状のアルキル側鎖を有する改変されたアミノ酸が含まれる。好ましくは、グループVIとして、セリン、システイン、またはトレオニンが挙げられる。

別の局面において、HJループの配列またはHJループのサブ配列中のアミノ酸残基についての好適な置換として、「シビアな(severe)」置換が挙げられる。これは、STKの活性を調節するペプチド誘導体を生じる。STKの活性を調節するペプチド誘導体を生じるシビアな置換は、セリン/トレオニンキナーゼのファミリーを通じて、高度に保存されている位置よりも、高度には保存されていない位置ではるかに多く起こりうるようである。図1は、STKのHJループの最初の約10個のアミノ酸のコンセンサス配列を示す。図2は、サイクリックAMP依存性キナーゼおよびプロテインキナーゼCのHJループの約20個のアミノ酸のコンセンサス配列を示す。STKファミリーの間で高度に保存されている位置、およびこれらの位置において一般的に見出される保存されたアミノ酸が示されている。STKファミリー



の間でそれほど高度には保存されていない位置は、「X」で示される。Dアミノ酸が、グリシンの水素側鎖と同一の位置に水素を有するので、Dアミノ酸またはそれらの類似体は、図1における6位または図2における6位および12位でグリシンについて置換され得る。

「シビアな置換」は、置換するアミノ酸（自然に存在するかまたは改変された）が、置換されるアミノ酸と比較して有意に異なる大きさおよび／または電気的特性を有する置換である。従って、置換するアミノ酸の側鎖は、置換されるアミノ酸の側鎖よりも有意に大きく（または小さく）、そして／あるいは置換されるアミノ酸とは有意に異なる電気的特性を有する官能基を有し得る。この型のシビアな置換の例として、アラニンについてのフェニルアラニンまたはシクロヘキシルメチル(cyclohexylmethyl)グリシンの置換、グリシンについてのイソロイシンの置換、対応するLアミノ酸についてのDアミノ酸の置換、またはアスパラギン酸についての $\text{-NH-CH[(-CH}_2\text{)}_5\text{-COOH]-CO-}$ の置換が挙げられる。あるいは、官能基は側鎖に付加され、側鎖から除去され、または別の官能基と交換されてもよい。この型のシビアな置換の例として、バリン、ロイシン、またはイソロイシンの脂

肪族側鎖にアミンまたは水酸基、カルボン酸を付加し、アスパラギン酸またはグルタミン酸の側鎖中のカルボン酸をアミンと交換し、あるいは、リジンまたはオルニチンの側鎖中のアミン基を除去することが挙げられる。なお別の代わりの方法においては、置換するアミノ酸の側鎖は、置換されるアミノ酸の官能基のものとは有意に異なる立体的特性および電気的特性を有し得る。このような改変の例として、グリシンについてのトリプトファン、アスパラギン酸についてのリジン、およびセリンの側鎖についての $\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{COOH}$ が挙げられる。これらの例は、限定を意味しない。

本明細書中に記載されているように、その活性がペプチドおよびペプチド誘導体によって調節され得るSTKの例として、以下のSTKファミリーに属するSTKが挙げられるが、これらに限定されない：poloファミリー（Gloverら、J. Cell Biol.、135：1681（1996））、Raf、有糸分裂活性化プロテインキナーゼ（MAPキナーゼ）、Akt/PKB（Frankら、Cell 88：435（1997）およびHemmingsら、Science 27

5:628(1997))、およびGタンパク質共役型受容体キナーゼ。他の好適なSTKとして、サイクリックAMP(cAMP)依存性プロテインキナーゼ、プロテインキナーゼC、カルモジュリン依存性キナーゼ、グリコーゲン合成キナーゼ-3(GSK3)、およびサイクリックGMP(cGMP)依存性プロテインキナーゼが挙げられる。

poloファミリーの好適なメンバーとして、Plk、Snk、およびSakが挙げられるが、これらに限定されない。Rafファミリーの好適なメンバーとして、Raf-1、A-Raf、およびB-Rafが挙げられるが、これらに限定されない。好適なGタンパク質依存性キナーゼとして、 $\beta$ -アドレナリン受容体キナーゼ1および2、ロドプシン(rhodopsin)キナーゼ(GRK1)、GRK4、GRK5、およびGRK6が挙げられるが、これらに限定されない。好適なMAPキナーゼとして、MAPK、MAPKK、およびMAPKKKが挙げられるが、これらに限定されない。また、プロテインキナーゼCイソ型も含まれ、これは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 1/H、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\eta$ (L)、 $\theta$ 、 $\mu$ 、 $\xi$ 、 $\iota$ お

よび $\lambda$ と命名されたイソ型を含むが、これらに限定されない。

本発明には、STKのHJループ中に見出される配列に対応するアミノ酸配列、そのサブ配列、およびその改変されたサブ配列を有するペプチドが含まれる。好適なサブ配列の例として、STKのHJループの[AA]<sub>1</sub>から[AA]<sub>20</sub>、[AA]<sub>3</sub>から[AA]<sub>10</sub>、[AA]<sub>7</sub>から[AA]<sub>14</sub>、[AA]<sub>11</sub>から[AA]<sub>18</sub>、[AA]<sub>3</sub>から[AA]<sub>14</sub>、[AA]<sub>7</sub>から[AA]<sub>18</sub>、および[AA]<sub>3</sub>から[AA]<sub>18</sub>に対応する配列、ならびにそれらのサブ配列が挙げられるが、これらに限定されない。図3は、以下のSTKのHJループの配列を示す：RAF、サイクリックAMP依存性キナーゼ、プロテインキナーゼC、Gタンパク質共役型受容体キナーゼ $\beta$ ARK1および2、ならびにGRK1、GRK4、GRK5、およびGRK6、カルモジュリン依存性キナーゼ、polo、Akt/PKB、ならびにGSK3。

図3はまた、ループ中のアミノ酸配列についての番号付けの概要を提供する。HJループのN末端のアミノ酸は1位であり、そして「[AA]<sub>1</sub>」と呼ばれ得る。「[AA]<sub>2</sub>」と呼ばれる、配列中の次のアミノ酸は2位であり、そしてアミノ酸[AA]<sub>3</sub>から[AA]<sub>20</sub>が続く。これらは、3位から20位である。従って、アミノ酸配列[AA]<sub>1</sub>から[AA]<sub>20</sub>を有する20マーのペプチドは、HJループ中に20個のアミノ酸を含む。上記の段落で示されるような、アミノ酸配列[AA]<sub>3</sub>から[AA]<sub>10</sub>を有するHJルー

プのペプチド誘導体は、上記のHJループ中の3番目のアミノ酸から10番目のアミノ酸までを含む。

本発明はまた、STKのHJループの改変された配列またはサブ配列に対応するアミノ酸配列を有するペプチドを含む。そしてこれは、RAF、サイクリックAMP依存性キナーゼ、プロテインキナーゼC、Gタンパク質共役型受容体キナーゼ $\beta$ ARK1、 $\beta$ ARK2、GRK1、およびGRK4~GRK6、カルモジュリン依存性キナーゼ、ならびにpoloを含む、STKの活性を調節する。1つの局面において、配列またはサブ配列中の1、2、またはそれ以上のアミノ酸が、保存的置換によって改変される；置換は、コンセンサスな位置で、コンセンサスではない位置で、または両方であり得る。別の局面において、配列またはサブ配列中の1、2、またはそれ以上の

アミノ酸が、シビアな置換によって改変される；置換は好ましくは、コンセンサスではない位置である。保存されたグリシン残基（例えば、図1における6位、または図2における6位および12位）の、D-アミノ酸残基またはその類似体での置換もまた、含まれる。図3はまた、RAF、サイクリックAMP依存性キナーゼ、プロテインキナーゼC、Gタンパク質共役型受容体キナーゼ $\beta$ ARK1、 $\beta$ ARK2、GRK1、およびGRK4~GRK6、カルモジュリン依存性キナーゼ、polo、Akt/PKB、およびGSK3のHJループについての保存的アミノ酸置換の例を提供する。

本発明のペプチド誘導体の特異的な例として、以下が挙げられる：ペプチドHJ-38（配列番号:13）、J-41（配列番号:14）、J-42（配列番号:15）、J-43（配列番号:16）、J-43.1（配列番号:17）、J-45（配列番号:18）、J-46（配列番号:19）、J-47（配列番号:20）、J-48（配列番号:21）、およびJ-29（配列番号:22）。これらの配列は、図4に示されている。上記のように、これらのペプチドのN末端および／またはC末端は改変され得る。図4に示されるように、これらのペプチドのN末端はアセチル化されており、そしてC末端はアミド化されている。上記のように、アミドおよびカルボン酸について他の保護基が使用され得る。必要に応じて、一方または両方の保護基が、除去され得る。ペプチドは、直鎖状または環状であり得る。

以下の配列を有するペプチドもまた、含まれる：HJ-38（配列番号:13）、J-41

(配列番号:14)、J-42 (配列番号:15)、J-43 (配列番号:16)、J-43.1 (配列番号:17)、J-45 (配列番号:18)、J-46 (配列番号:19)、J-47 (配列番号:20)、J-48 (配列番号:21)、およびJ-29 (配列番号:22)。ただし、ペプチド中の任意の1つのアミノ残基は変化し得、任意の自然に存在するアミノ酸またはその類似体であり得る。本発明はまた、ペプチド中の任意の2つのアミノ残基が変化し得て、任意の自然に存在するアミノ酸またはその類似体であり得るような配列を有するペプチドを含む。

本発明はまた、STKのHJループの改変された配列またはサブ配列に対応するア

ミノ酸配列を有する環状のペプチドを含む。そしてこれは、STKの活性を調節する。

「環状のペプチド」は、例えば、N末端の窒素原子とC末端のカルボニル炭素との間でのペプチド結合によって環が形成される、ペプチドまたはペプチド誘導体をいう。

「環化される」はまた、化合物のN末端の窒素と、ペプチド中の好適なアミノ酸（好ましくは、C末端のアミノ酸）の側鎖との間での共有結合によって環を形成することをいう。例えば、アミドは、N末端の窒素原子と、アスパラギン酸またはグルタミン酸の側鎖中のカルボニル炭素との間で形成され得る。あるいは、ペプチドまたはペプチド誘導体は、化合物のC末端のカルボニルと、ペプチド中の好適なアミノ酸（好ましくは、N末端のアミノ酸）の側鎖との間で共有結合を形成することによって環化され得る。例えば、アミドは、C末端のカルボニル炭素と、リジンまたはオルニチンの側鎖中のアミノ窒素原子との間で形成され得る；エステルは、C末端のカルボニル炭素と、セリンまたはトレオニンの側鎖中のヒドロキシル酸素原子との間で形成され得る。

「環化される」はまた、ペプチド中の2つの好適なアミノ酸（好ましくは、末端のアミノ酸）の側鎖の間での共有結合によって環を形成することをいう。例えば、ジスルフィドは、2つのシステインの側鎖中のイオウ原子の間で形成され得る。あるいは、エステルは、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸の側鎖中のカルボニル炭素と、例えば、セリンまたはトレオニンの側鎖中の酸素原子と

の間で形成され得る。アミドは、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸の、側鎖中のカルボニル炭素と、例えば、リジンまたはオルニチンの側鎖中のアミノ窒素との間で形成され得る。

さらに、ペプチドまたはペプチド誘導体は、2つの末端の間で、一方の末端とペプチドまたはペプチド誘導体中のアミノ酸の側鎖との間で、あるいは、ペプチドまたはペプチド誘導体中の2つのアミノ酸の側鎖の間で、連結基を用いて環化

され得る。好適な連結基は、Loblら、WO 92/00995号およびChiangら、WO 94/159 58号に開示されている。その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

元のアミノ酸配列またはサブ配列中の好適な置換は、上記に定義されるように、STKの活性を調節するペプチド誘導体を生じる置換である。STKの活性は、STKの活性が増大させられるかまたは減少させられる場合に、「調節される」。STKの活性における増大または減少は、試験されるSTKのタンパク質基質のリン酸化の程度をインビトロで評価することによって、あるいは、STKの制御下にある細胞の活性または機能における調節、増大、または減少を対応させることによって、検出され得る。これらの細胞の機能の例として、細胞の増殖、細胞の分化、細胞の形態、細胞の生存性またはアポトーシス、外部刺激に対する細胞の応答、遺伝子の発現、脂質の代謝、グリコーゲンの代謝、および有糸分裂が挙げられる。

ペプチドまたはペプチド誘導体がSTKの活性を調節するかどうかは、STKによって制御される1つ以上の細胞の活性を有する細胞を提供することによって、容易に決定され得る。細胞は、セリン／トレオニンキナーゼの活性を評価するために好適な条件下で、試験混合物を産生するために、ペプチドまたはペプチド誘導体とともにインキュベートされる。STKの活性が評価され、そして好適なコントロール（例えば、ペプチドまたはペプチド誘導体の非存在下で同じ条件下でインキュベートした同じ細胞の活性）と比較される。コントロールと比較して、試験混合物中のSTKのより大きいまたはより小さい活性は、試験ペプチドまたはペプチド誘導体が上記のSTKの活性を調節することを示す。

アッセイに好適な細胞として、膜結合性のSTKまたは細胞内STKを発現する正常な細胞、STKを発現するように遺伝子操作されている細胞、STKを発現する悪性の

細胞、またはSTKを発現する固定化された細胞が挙げられる。

STK活性を評価するために好適な条件として、STKの制御下の細胞の活性または機能の活性を評価するために好適な条件が挙げられる。一般的には、細胞の活

性または機能は、細胞が細胞の増殖のために好適な条件（好適な温度（例えば、約30℃から約42℃）、および培地中の好適な濃度の栄養分の存在（例えば、アミノ酸、ビタミン、増殖因子）を含む）に曝される場合に、評価され得る。

別の局面において、特定のSTKの活性（例えば、Atk/PKB、Dudekら、Science 275 : 661 (1997)）は、血清枯渇条件下で細胞を増殖させることによって評価され得る。細胞は、代表的には、ウシの血清、ウマの血清、またはウシの胎児の血清のような血清の存在下の培養物中で増殖される。多くの細胞（例えば、PC-12細胞のような神経細胞）は、一般的には、血清が不十分である場合には生存できない。細胞を培養するために不十分な血清の使用は「血清枯渇条件」と呼ばれ、そして例えば、0%から約4%までの血清を含む。STK活性は、ペプチドまたはペプチド誘導体が血清の枯渇の結果として細胞（例えば、神経細胞）を保護し得る程度によって決定される。特異的な条件は、Dudekら、および「細胞内シグナル伝達を選択的に調節するショートペプチド (SHORT PEPTIDES WHICH SELECTIVELY MODULATE INTRACELLULAR SIGNALLING)」と表題をつけられた、同時系属中であり、そして並行して提出された出願（1997年5月21日に提出された、代理人登録番号CMCC-547）の実施例4に提供されている。その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

一般的には、試験混合物中のSTKの活性は、STKが制御する細胞の活性の定量的な測定を行うことによって評価される。細胞の活性は、例えば、細胞の増殖であり得る。STKによって増殖が制御されている細胞の例として、ウシの大動脈の細胞、マウスのMSI細胞、またはマウスのSVR細胞のような内皮細胞（Arbiserら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 861 (1997)を参照のこと）、血管の平滑筋細胞、および、乳ガン、肺ガン、結腸ガン、前立腺（prostate）ガン、黒色腫のような種々の組織の悪性細胞が挙げられる。STK活性は、例えば、本来存在する細胞の数と、所定の期間後に存在する細胞の数とを比較することによって、細胞の

増殖を測定することによって評価される。細胞の増殖に關与するSTKは、

poloファミリー、Taf、またはAtk/PKBのメンバーである。STKが細胞の分化を制御している細胞（例えば、STK Akt/PKB、GSK3、およびプロテインキナーゼAを発現する3T3-L1のような前脂肪細胞—Kohnら、J. Biol. Chem. 271 : 31372 (1996) を参照のこと）が使用される場合、活性は、分化の程度を測定することによって評価される。活性は、グルコースの取り込み、脂質生成、またはグリコーゲンの代謝における変化を測定することによって、初代脂肪細胞、肝細胞、および繊維芽細胞のような細胞の代謝活性における変化によって評価され得る（例えば、Weiseら、J. Biol. Chem. 270 : 3442 (1995) を参照のこと）。活性はまた、遺伝子の発現、細胞の形態または細胞の表現形が変更される程度（例えば、細胞の形状が変更される程度、または細胞が紡錘型様構造をとる程度）によっても評価され得る。細胞の形態における変化の一例が、「細胞内シグナル伝達を選択的に調節するショートペプチド (SHORT PEPTIDES WHICH SELECTIVELY MODULATE INTERCELLULAR SIGNALLING)」と表題をつけられた、同時系属中であり、そして並行して提出された出願(1997年5月21日に提出された、代理人登録番号CMCC-547)において報告されている。これは、プロテインチロシンキナーゼのHJループの特定のペプチド誘導体が、血管の平滑筋細胞を伸張させ、そして紡錘型様の形状をとらせ得ることを開示している。

細胞の増殖を評価することによってSTKの活性を決定するために好適な条件の特異的な例が、実施例2に提供される。

ペプチドまたはペプチド誘導体が、STKの制御下の細胞の活性または機能を調節するかどうかを決定するための、本明細書中で上記に記載されているアッセイが、本明細書中に詳細に記載されている細胞以外の細胞を用いて行われ得ることが理解される。いまだなお発見されていないSTKまたはその機能がなおまだ知られていないSTKもまた、一旦、それらが細胞の機能または活性を制御することが決定されると、このアッセイにおいて使用され得る。これらのSTK細胞もまた、本発明の範囲内である。

本発明はまた、被験体中のセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する方法にも関する。「被験体」は、好ましくはヒトであるが、治療を必要としている動物（例えば、家畜動物（例えば、イヌ、ネコなど）、飼育動物（例えば、ウシ、ブタ、ウマなど）、および実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモットなど））でもあり得る。

被験体中のSTKの活性は、STKの過剰な活性または低水準の活性によって引き起こされる疾患を治療する目的のために、調節され得る。例えば、MAPキナーゼ（SegerおよびKrebs、FASEB J. 9 : 726 (1995)）およびサイクリン依存性プロテインキナーゼ（「細胞の分子生物学 (Molecular Biology of the Cell)」Alberts, Bray, Lewis, Raff, RobertsおよびWatson編、第5章 (Garland Publishing, Inc.)、(1994)）は、真核生物細胞の細胞の分化サイクルの制御システムの中心的な構成要素である。他のSTK（例えば、プロテインキナーゼC、Rafキナーゼ (Nishizuka、The FASEB Journal 9 : 484 (1995)、Locricら、Oncogene 12 : 1109 (1996) およびLairdら、J. Biol. Chem. 270 : 26,742 (1995)）、およびGタンパク質共役型受容体 (Lange-Carterら、Science 260 : 315 (1993)）は、順番に、MAPキナーゼの制御に関与しているか、または有糸分裂の間に活性化される。一方、Gタンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) は受容体を脱感作し、それによって種々のホルモン性の応答の調節に関与している (FreedmanおよびLefkowitz、Recent Prog. Hormon. Res. 51 : 319 (1996)）。Akt/PKBの活性化は、アポトーシス、すなわち、プログラムされた細胞死の阻害に関係していることが示されている (Frankら、Cell 88 : 435 (1997)、およびHemmings、Science 275 : 628 (1997)）。これらの酵素の活性を調節する本発明のペプチドおよびペプチド誘導体は、治療有効量で被験体に投与された場合に、被験体のガンを治療するために使用され得る。

cAMP依存性キナーゼ、GSK3、およびAkt/PKBは、グリコーゲンの代謝の制御に関与している。cAMP依存性キナーゼの活性を調節する本発明のペプチドおよび

ペプチド誘導体は、治療有効量で被験体に投与された場合に、被験体のII型糖尿病および出血性のショックを治療するために使用され得る。cAMP誘導体はまた、



ヒトのガン細胞の増殖を阻害することが報告されており(Katsrosら、FEBS Lett . 223 : 97 (1987))、このことは、cAMP依存性キナーゼのインヒビターもまたガンの治療に有用であることを示している。

Rafキナーゼは、脂質の代謝の制御に関与している。Rafキナーゼの活性を調節する本発明のペプチドおよびペプチド誘導体は、治療有効量で被験体に投与された場合に、被験体の肥満症を治療するために使用され得る。

プロテインキナーゼCの活性を調節する試薬は、心臓血管の疾患（例えば、血栓症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、心筋肥大症、虚血、再灌流損傷、および高血圧）、免疫抑制性および炎症性の障害（例えば、喘息、乾癬、全身性の紅斑性狼瘡、真性糖尿病、器官移植拒絶の抑制、多発性硬化症、炎症性の腸疾患、およびAIDS）、中枢神経系の疾患（例えば、アルツハイマー病、発作、および精神的な外傷）、プロテインキナーゼCの活性に基づく敗血症のショック、ならびに虚血によって誘導される腎不全を含む、広範な種々の疾患状態を治療するために使用され得る（Nambi、WO 93/16703号、Bradshawら、Agents Action 38 : 135 (1993)、およびBirchallら、The J. Pharm. And Exper. Therapeut. 2 : 922 (1994)）。プロテインキナーゼCの活性を調節する本発明のペプチドおよびペプチド誘導体は、治療有効量で被験体に投与された場合に、被験体のこれらの疾患を治療するために使用され得る。

Gタンパク質受容体キナーゼによるリン酸化は、受容体の脱感作を生じ、これによって、例えばアドルナリンの、ホルモン性の影響の持続期間を延長することが公知である（FreedmanおよびLefkowitz、Recent Prog. Hormon. Res. 51 : 319 (1996)）。従って、Gタンパク質受容体キナーゼの活性を調節する試薬は、ドーパミンのような対応するリガンドのより低い生体利用性によって生じる、疾患の治療における可能性を有する。カルモジュリン依存性キナーゼのインヒビタ

ーは、ドーパミンの放出を阻害することが報告されている（Nagatsuら、Biochem . Biophys. Research, Commun. 143 : 1045 (1987)）。従って、Gタンパク質受容体キナーゼおよびカルモジュリン受容体キナーゼの活性を調節する試薬は、例えば、パーキンソン病のような、ドーパミンのシグナル伝達の不能に関与する疾

患の治療において潜在的に有用である。カルモジュリン依存性キナーゼのインヒビターはまた、動脈の筋肉を弛緩させることが報告されており（Saitohら、J. Bio. Chem. 262 : 7769 (1987)）、従って、高血圧を治療することにおいて可能性を有する。GSK3の阻害は、インシュリン受容体の細胞内活性を増大し得、それによってグルコースの取り込みおよび他の関連する代謝活性を増強する。このように、GSK3の活性を調節する試薬は、I型糖尿病およびII型糖尿病の治療において潜在的に有用である。

本明細書中で開示される方法に基づいて、ペプチドおよびペプチド誘導体は、そのHJループが配列決定されており、そしてその細胞の機能が既知であるSTKの活性を調節するように設計され得る。結果として、ペプチドおよびペプチド誘導体は、これらの細胞の機能に影響を与える（増大させるまたは減少させる）ように設計され得る。将来の研究は、もともになる原因が現在知られていない特定の疾患状態が、STKによって制御される細胞の機能の過剰な反応性および低水準の反応性によってもたらされることを明らかにする可能性がある。これらの疾患は、過剰な反応性または低水準の反応性のSTKのHJループのペプチド誘導体であるペプチドを投与することによって、治療され得る。好適なペプチドおよびペプチド誘導体は、本明細書中に開示される方法によって同定され得る。これらの治療方法、ペプチドおよびペプチド誘導体は、本発明の範囲内に含まれる。

「治療有効量」は、治療しない場合の典型的な臨床結果と比較して、治療の結果として、改善された臨床結果を生じる化合物の量である。「改善された臨床結果」には、治療の結果として、疾患を有する個体についてのより長い生存の見込みが含まれる。「改善された臨床結果」はまた、治療の結果として、より少ない

症状または疾患の合併症を経験する疾患を有する個体を生じ得る。ガンに関して、「改善された臨床結果」には、より長い生存の見込みが含まれる。腫瘍の増殖速度を遅らせるかまたは停止させること、腫瘍の大きさの縮小を生じること、転移速度を低下させること、および／または改善された生活の質（例えば、身体的な不快感の減少、または運動性の増大）もまた、含まれ得る。

糖尿病に関して、改善された臨床結果は上記のような、より長い生存の見込み

、疾患の合併症（例えば、神経症、網膜障害、腎障害、および血管の退化）の減少、および改善された生活の質をいう。

肥満症に関して、改善された臨床結果は、摂取カロリーあたりの体重の減少の増大をいう。これはまた、肥満症の結果である合併症（例えば、動脈硬化および高血圧のような心臓疾患）の減少をもいう。

個体に投与されるペプチドまたはペプチド誘導体の量は、疾患のタイプおよび重篤度、ならびに個体の特性（例えば、一般的な健康状態、年齢、性別、体重、および薬物に対する耐性）に依存する。当業者は、これらおよび他の因子に依存して好適な投与量を決定することが可能である。典型的には、ペプチドまたはペプチド誘導体の治療有効量は、成人について1日あたり約1mgから1日あたり約1000mgまでの範囲であり得る。好ましくは、投与量は、1日あたり約1mgから1日あたり約100mgまでの範囲である。

本発明のペプチドおよびペプチド誘導体は、好ましくは、非経口的に投与される。非経口的な投与として、例えば、筋肉内、静脈内、皮下、または腹腔内注射によるような全身的投与が挙げられ得る。タンパク質分解に抵抗するペプチドまたはペプチド誘導体は、例えば、カプセル剤、懸濁物、または錠剤で、経口的に投与され得る。

ペプチドまたはペプチド誘導体は、上記の疾患を治療するための薬学的組成物の一部として、受容可能な薬学的担体と組み合わせて個体に投与され得る。好適な薬学的担体は、ペプチドまたはペプチド誘導体とは相互作用しない不活性な成

分を含み得る。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載されている技術のような、標準的な薬学的処方技術が使用され得る。非経口投与に好適な薬学的担体として、例えば、滅菌水、生理食塩水、静菌性の食塩水（約0.9%mg/mlのベンジルアルコールを含有する食塩水）、リン酸緩衝化食塩水、Hank's溶液、Ringer's乳酸塩などが挙げられる。組成物をカプセル化するための方法（例えば、硬質のゼラチンまたはシクロデキストランのコーティング中）は、当該分野で公知である（Bakerら、Controlled Release of Biological Active Agents, John Wiley & Sons、1986）。

本発明のペプチドおよびペプチド誘導体は、治療以外の多くの有用性を有する。これら用途のいくつかは、以下の段落で議論される。

本発明のHJループペプチドは、自然のタンパク質中で直線状である配列から誘導される。従って、これらは、STKに対する特異的な抗体の調製において有用であり得る。さらに、HJループの配列がSTKの各サブファミリーにおいて独特であるので、抗HJループ抗体は、STKの異なるサブファミリーを単離するために特異的に使用され得る。

好適な抗体は、好適な担体（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは血清アルブミン）と組み合わせることによって、HJループペプチドに対して惹起され得る；ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の産生は、任意の好適な技術を使用して行われ得る。種々の方法が記載されている（例えば、Kohlerら、Nature, 256 : 495-497 (1975) およびEur. J. Immunol. 6 : 511-519 (1976) ; Milsteinら、Nature 266 : 550-552 (1977) ; Koprowskiら、米国特許第4,172,124号 ; Harlow, E. およびD. Lane、1988、Antibodies : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory : Cold Spring Harbor, NY) ; Current Protocols In Molecular Biology、第2巻（補遺27、1994年夏）、Ausubel, F.M. ら編、(John Wiley & Sons: New York, NY)、第11章（1991）を参照のこと）。一般的には、ハイブリドーマが、抗体を産生する細胞と好適な固定化した細胞株（

例えば、SP2/0のような骨髓腫細胞株）とを融合させることによって産生され得る。抗体を産生する細胞（好ましくは、脾臓またはリンパ節の細胞）は、目的の抗原で免疫された動物から得ることができる。融合された細胞（ハイブリドーマ）は、選択的な培養条件を使用して単離され得、そして限界希釈することによってクローン化され得る。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、好適なアッセイ（例えば、ELISA）によって選択され得る。

HJループペプチドに対する抗体（モノクローナル抗体を含む）は、種々の用途を有する。例えば、HJペプチドが由来するタンパク質に対するかまたはそれと反応する抗体、そして好ましくは、上記のタンパク質に特異的に結合する抗体は、細胞表面上にそのタンパク質を提示する細胞を同定および／または分離する（例

えば、蛍光活性化細胞分離または組織学的分析の手段による) ために使用され得る。タンパク質に特異的なモノクローナル抗体はまた、細胞の表面上に発現されるタンパク質または試料中に存在するタンパク質を、検出および/または定量する(例えば、ELISAにおいて) ためにも使用され得る。あるいは、抗体は、細胞内STKが細胞の細胞質中に存在するかどうかを決定するために使用され得る。細胞の透明な溶解物が生成され(たとえば、水酸化ナトリウム(0.2N) およびドデシル硫酸ナトリウム(1%) で細胞を処理し、遠心分離し、そしてペレットから上清を分離することによって)、そしてSTKに特異的な抗HJループ抗体で処理される。次いで、透明な溶解物は、例えば、ウェスタンブロッティングまたは免疫沈降によって、STKと抗体との間の複合体について分析される。いくつかのSTKは、刺激後に、膜に結合するか、または細胞骨格と会合するようになる。抗HJループ抗体は、特異的な抗HJループ抗体との組合せで、免疫蛍光、イムノペルオキシダーゼ技術、および免疫電子顕微鏡のような従来の免疫細胞化学の適用によって、種々の生理学的条件下でのSTKの種々のサブファミリーの細胞内分布(区画化) の研究のために利用され得る。

免疫原と反応する抗体もまた、有用である。例えば、これらは、試料中の免疫

原を検出および/または定量するため、あるいは、免疫原を精製する(例えば、イムノアフィニティー精製による) ために使用され得る。

STK中のHJループは、本発明のペプチドおよびペプチド誘導体がSTKの活性に対してこのような劇的な影響を有するという事実によって証明されるように、STKの活性を調節することにおいて鍵となる役割を果たす。本発明のHJループペプチドはまた、特異的なSTKのHJループと相互作用し、そしてSTKの活性を調節するリガンドを同定するためにも使用され得る。例えば、特異的なHJループが直接またはリンカーを介して共有結合されているアフィニティーカラムが、調製され得る。次いで、このカラムは、HJループペプチドに結合し、そしてまた、HJループペプチドが由来するSTKにもおそらく結合する特異的なリガンドを単離および同定するために、利用され得る。次いで、リガンドは、カラムから溶出され得、特徴付けられ得、そしてSTK機能を調節するその能力について試験され得る。

プロテインチロシンキナーゼは、プロテインキナーゼの別のクラスである。これらのタンパク質は、膜内外のシグナル伝達に關与する膜結合受容体として、または核へのシグナル伝達を含む細胞内でのシグナル伝達において役割を果たす細胞内タンパク質として存在する。リガンドの結合は、キナーゼによる細胞内タンパク質のチロシン残基のリン酸化によって開始されるシグナル伝達を生じる。STKと同様に、チロシンキナーゼは、このリン酸化機構の手段によって細胞の機能を制御する。チロシンキナーゼは、HJループを含むSTKと高い程度の相同性を有する。結果として、チロシンキナーゼの活性およびそれらが制御する細胞機能は、STKについて上記で考察されるように、それらのHJループのペプチド誘導体であるペプチドで調節され得る。プロテインチロシンキナーゼのHJループのペプチドおよびペプチド誘導体、ならびにその使用方法は、「細胞内シグナル伝達を選択的に調節するショートペプチド (SHORT PEPTIDES WHICH SELECTIVELY MODULATE INTERCELLULAR SIGNALLING)」と表題をつけられた、同時系属中であり、そして並行して提出された出願 (代理人登録番号CMCC-547、1997年5月21日に出願さ

れた) に開示されている。その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

本発明の化合物におけるペプチド配列は、固相ペプチド合成 (例えば、BOCまたはFMOC) 法によって、液相合成によって、あるいは上記の方法の組み合わせを含む他の好適な技術によって合成され得る。確立され、そして広範に使用されているBOCおよびFMOC法は、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 88: 2149 (1963) ; Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, C.H. Li編、Academic Press、1983、48-267頁 ; ならびにBaranyおよびMerrifield、The Peptides、E. GrossおよびJ. Meienhofer編、Academic Press、New York、1980、3-285頁に記載されている。固相ペプチド合成の方法は、Merrifield, R.B.、Science、232: 341 (1986) ; Carpino, L.A. およびHan, G.Y.、J. Org. Chem.、37: 3404 (1972) ; ならびにGauspohl, H.ら、Synthesis、5: 315 (1992) ) に記載されている。これらの参考文献の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

ペプチド配列を有する化合物を環化する方法は、例えば、Loblら、WO 92/00995に記載されている。その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。環化さ

れる化合物は、環の閉鎖に使用される2つのアミノ酸の側鎖を、全ての他の側鎖保護基を完全なままにしながら選択的に除去され得る基を用いて保護することによって調製され得る。選択的な脱保護は、直交する側鎖の保護（例えば、アリル（OAl）（グルタミン酸またはアスパラギン酸の側鎖中のカルボキシル基について）、アリルオキシカルボニル（Alloc）（例えば、リジンまたはオルニチンの側鎖中のアミノ窒素について）、あるいはアセトアミドメチル（Acm）（システインのスルフヒドリルについて）保護基）を使用することによって最も良好に達成される。OAlおよびAllocは、Pd<sup>0</sup> によって容易に除去され、そしてAcmは沃素処理によって容易に除去される。

本発明を以下の実施例により説明するが、これらは何ら限定を意図するものではない。

#### 実施例1 — HJペプチドの調製

本発明の新規化合物を製造業者のプロトコールによるFmoc技術を使用する適用生体系からの430Aペプチドシンセサイザーを利用して合成することができる。ペプチド調製に対する他の適した方法が当業者に知られている。例えば、Merrifield, R. B., Science, 232:341(1986); Carpino, L. A., Han, G. Y., J. Org. Chem., 37:3404(1972); Gauspohl, H. ら、Synthesis, 5:315 (1992) を参照、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

リンクアミド樹脂[4(2', 4'ジメトキシフェニル-FMOCアミノメチル)フェノキシ樹脂]をC-アミド化したペプチドの合成に用いた。アミノ酸のアルファアミノ基をFMOC基で保護し、それを各々のサイクルの初めに、弱塩基であるN-メチルピロリドン(NMP)中20%ピペリジンによって除去した。脱保護の後、樹脂をNMPで洗浄し、ピペリジンを除去した。HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)とDMF(ジメチルホルムアミド)に溶解したHBTU(2(1-ベンゾトリアゾリル-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム)を使用したFASTMOC化学作用によってアミノ酸誘導体のインサイチュ活性化を行った。該アミノ酸をNMPを添加したこの溶液に溶解した。DIEA(ジイソプロピルエチルアミン)を添加し、活性化を開始した

。あるいは、DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）とHOBtの活性方法を利用して、HOBtの活性エステルを形成した。NMP中でカップリングを行った。（任意の）N-末端のアセチル化の後、結晶性フェノール0.75g、EDT（1,2-エタンジチオール）0.25ml、チオアニソール0.5ml、D.I. H<sub>2</sub>O 0.5ml、TFA 10mlを使用して樹脂及び側鎖保護基からのペプチドのTFA（トリフルオロ酢酸）開裂手順を適用した。

実施例2 — Raf及びPoloのHJペプチド誘導体はインビトロで内皮細胞の増殖を調節する

ウシ大動脈細胞（本明細書で「A19細胞」と表現されている）を、Gospodorowiczら、Proc. Natl. Acad. Sci. 73:4120（1976）で開示された手順で得た。マウスのMS1及びSVR細胞をArbiserら、Proc. Natl. Acad. Sci. 94:861（1997）で開示された手順で得、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

ガラスで覆った2回蒸留水（DDW）中に0.100ml/ウェルの新たに濾過した1%ゼラチンを添加することによって細胞の塗布の直前に、96ウェル、平底、組織培養マイクロタイタープレート（Difco）をゼラチン（Difco）でプレコートした。ウェルを37℃で約1時間インキュベートし、次いで過剰の溶液を吸引によって除去した。

培養培地をDMEM、すなわちペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン（100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、及び2mMグルタミン）及び10%エンドトキシンフリー子牛血清（ハイクローン）から調製した。25×10<sup>3</sup>細胞/mlで試験した細胞型の懸濁液を前記培養培地で調製し、0.160ml/ウェル（約4000内皮細胞/ウェル）に分配した。

HJペプチドストック溶液の系列を、0.1%BSAを含むリン酸緩衝溶液（PBS）で100%DMSO中のHJペプチドの10mM溶液を希釈することによって調製した。各ストック溶液中のHJペプチドの濃度をアッセイ混合物中のHJペプチドの所望濃度の9倍に調節した。

0.020mlの各HJペプチドストック溶液を細胞の塗布の約2時間後に対応するウェルに添加し、それぞれの濃度について6回実験した。さらに、HJペ



プチドを添加しないBSA溶液をコントロールとして用いた。該ウェルを72～80時間37℃で10%CO<sub>2</sub>加湿インキュベーター中でインキュベートした。

プレートを標識し、培地を捨てた。次いで、各々のプレートをPBS (0.200ml/ウェル) で1回洗浄した。次いで、ウェルを100%エタノール (0.

200ml/ウェルで5分間) で洗浄することによって固定した。エタノールを取り除き、ウェルを完全に乾燥した。あるいは、少なくとも30分間4%ホルムアルデヒドPBS (フィッシャー・サイエンティフィック、カタログ番号HC200-1からのPBS緩衝化10%ホルマリン) (0.12ml/ウェル) で該ウェルを固定した。ホルムアルデヒドで固定して、エタノールと比較してO.D. を高めた。

ウェルを、ホウ酸緩衝液 (0.1M、pH8.5) で1回洗浄した。次いで、新たに濾過した1%メチレンブルー溶液 (0.600ml/ウェル) をウェルに添加し、室温で10分間インキュベートした。次いで、該ウェルを水道水で5回洗浄し、その後該ウェルを完全に乾燥した。0.200ml/ウェルの0.1N

HCl (0.1N) を添加し、色を抽出した。一晚抽出後、O.D. を630nmで読み、ウェルごとの細胞の数を決定した。細胞を数える手順は、Oliverら、J. of Cell Sci., 92:513(1989)により詳細に述べられ、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

種々のHJペプチドの数の結果を表に示す。

表

ペプチド	SVR 細胞に ついてのS.I.* ( $\mu$ M)	MS1 細胞に ついてのS.I.* ( $\mu$ M)	A19 細胞に ついてのS.I.* ( $\mu$ M)
HJ38	10	10	試験せず
J41	試験せず	10	試験せず
J42	10	試験せず	10
J43	試験せず	試験せず	40

\*細胞増殖の有意な阻害が観察された濃度

表の結果からなり得るように、Raf及びPoloのHJペプチド誘導体はウシ大動脈細胞並びに形質転換したマウス細胞株MS1及びSVRの細胞増殖を阻

害した。

実施例3 — アクチビン/TGF $\beta$ R KO48H101 (配列番号: 24) のHJペプチド誘導体は胎児の肺の繊維芽細胞によるコラーゲン産生を阻害する

#### 細胞

胎児の肺の繊維芽細胞を0.5%FCSを含むDMEM培地に懸濁し、96ウェル平底組織培養プレートに1ウェル当たり50,000細胞の濃度(1ウェル当たり45 $\mu$ l)で播種する。熱活性化されたTGF $\beta$ を含む条件の培地(MCF-7細胞から選択する)45 $\mu$ lの存在下及び試験したペプチドの増加する濃度(10 $\mu$ lのPBS+0.1%BSA+1%DMSO中に0~10 $\mu$ M)の非存在下又は存在下で、48時間インキュベートする。全容量は、1ウェル当たり100 $\mu$ lである。

#### 可溶性コラーゲン

インキュベーション期間の終わりに、上澄みを取り除き、新しい組織培養プレート内に1ウェルアリコート当たり50 $\mu$ lで塗布する。プレートを37℃で24時間湿潤な雰囲気中でインキュベートし、次いで37℃で24時間乾燥してコラーゲンを付着させる。乾燥プレートを蒸留水で3回、1ウェル当たり200 $\mu$ lで1洗浄当たり1分間洗浄し、1ウェル当たり飽和したピクリン酸(w/v)中100 $\mu$ lの0.1%ダイレクトレッド(direct red)80で1時間室温中で染色する。過剰な染料を、10mMのHClで5回、1ウェル当たり200 $\mu$ lで1洗浄当たり10秒間ウェルを洗浄することによって除去する。コラーゲンと結合した染料を1ウェル当たり200 $\mu$ lの0.1M NaOHで溶出し、540nmで読む。

#### 細胞の計数

上澄みを除去した後、細胞を1ウェル当たり200 $\mu$ lの緩衝化ホルマリンで

1時間室温で固定し、次いで1ウェル当たり200 $\mu$ lの0.1Mホウ酸緩衝液で洗浄する。固定した細胞を、1ウェル当たり50 $\mu$ lの1%メチレンブルーで

15分間室温で染色する。過剰な染料を、水道水で洗浄する。細胞と結合した染料を1ウェル当たり200 $\mu$ lの0.1MのHClで溶出し、595nmで読む。コラーゲンを細胞ごとに表す。

KO48H101（配列番号：24）の結果を図5に示す。図5から分かるように、1 $\mu$ MのKO48H101のような低い濃度でほぼ完全なコラーゲン産生の阻害が起こる。約0.6 $\mu$ MのKO48H101の存在下で約80%の阻害が起こる。

コラーゲン産生の阻害は、例えば形成手術での、瘢痕形成の阻害及び癒着形成の阻害、腹部手術の重い合併症に対して有効であり得る。

実施例4 — インテグリン架橋化キナーゼ（ILK）K107H101（配列番号：47）のHJペプチド誘導体はB16黒色腫細胞で形態変化を引き起こす

インテグリン架橋化キナーゼ（ILK）と名付けられたセリン／トレオニンキナーゼのHJループ由来のペプチドであるK107H101の存在下でインキュベートした場合、B16黒色腫細胞で形態変化が観測された。Wu C. ら、J. Bio. Chem. 273:528-536(1998))で述べられるように、ILKは腫瘍形成に関係している。従って、ILK誘導ペプチドは抗腫瘍剤として有効であり得る。Wuらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

均等物

当業者は、日常的な実験を用いるだけで、本明細書に記載された発明の特定の態様に対して数多くの均等物を認識し、確かめることができるであろう。かかる均等物は、以下の請求の範囲に含まれることを意図する。

【図1】

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Y/F	X	L/M	L/M/A/I	X	G/A	X	疎水性	P	F/Y

Figure 1

【図2】

1 Y	2 E	3 M	4 L/M/A	5 X	6 G	7 X	8 P	9 P	10 F
11 X	12 A/G	13 D/E/Q	14 D/E/Q/N	15 P/E	16 D/E/I	17 D/E/Q	18 I/L	19 Y/F	20 Q/E

Figure 2

【図3】

セリン／トレオニンキナーゼ																			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
RAF	Y	E	L	M	T	G	E	L	P	Y	S	H	I	N	N	D	Q	I	I
	F	Q	I	A	A	A	Q	I	F	A	T	N	L	D	D	N	E	L	L
	W	E*	M	S	S	Q	D	M	W	Q	Q	D	M	D	Q	D*	E*	M	M
		N	V			E*	E*	V				E	V	Q	E	E	V	V	V
		D				D*						E*		E*	E*	D*			
		D*																	
CAPK	Y	E	M	A	A	G	Y	P	P	F	Y	A	D	Q	I	Q	I	E	Q
	F	Q	V	V	V	A	F		F	Y	W	G	N	E*	M	E	L	F	W
	W	E*	L	M	L	A	W		W				D*	V	N	N	M	N	N
		D	I	I	I							Q	E		D*	D*		D	D*
		D*										E*	D*						
		N										E*	D*						
PKC	Y	E	M	A	A	G	Y	P	P	F	Y	A	D	Q	I	Q	I	E	Q
	F	Q	V	V	V	A	F		F	Y	W	G	N	E*	M	E	L	F	W
	W	E*	L	M	L	A	W		W				D*	V	N	N	M	N	N
		D	I	I	I							Q	E		D*	D*		D	D*
		D*										E*	D*						
		N										E*	D*						
βARK1.2	F	K	L	R	G	H	S	P	F	Y	W	Q	H	K	O	D	N	E	Q
	Y	O	I	X	A		T	X	X			E		O		D*	Q	N	N
	W		M					W				D		S		E*	E*	D*	E*
			V																

Figure 3A



【図3】

GRK5	Y	E	M	I	E	G	Q	S	P	F	R	G	R	K	E	K	V	K	R	E
	F	E*	I	L	E*	A	N	T	W	X	A	X	O	H	E*	O	M	O	X	E*
	W	D	L	M	D				Y						D	H	I	H		D
		D*	V	V	D*										D*		L			D*
GRK6	Y	E	M	I	A	G	Q	S	P	F	Q	Q	R	K	K	I	I	K	R	E
	F	E*	I	L	G	A	N	T	W	N	Y	X	O	H	O	M	H	O	X	E*
	W	D	L	M														V	H	E*
		D*	V	V													L			D*
GSK3	A	E	L	L	L	G	Q	P	I	F	P	G	D	S	G	V	D	Q	L	V
	G	E*	I	I	A	N			L	Y	A	D*	T	A	L	D*	N	I	I	L
		D	M	M	M				M	W		E			I	E	M	M	I	M
		D*	V	V	V				V			E*			M	E*		V		

D\* = アスパラギン酸の、置換または非置換の脂肪族、ベンジル  
または芳香族のエステル

E\* = グルタミン酸の、置換または非置換の脂肪族、ベンジル  
または芳香族のエステル

X = N-ニトロアルギニン(N-nitroarginine)、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアルギニン、  
アミノシトルリン(amidinocitrulline)または2-アミノ-4-グアニジノブタン酸

O = オルニチン

Figure 3C

【図 4】

<u>RAE</u>												
HJ38	Ac-	V	M	T	G	Q'	L	P	F	-NH <sub>2</sub>		
J41	Ac-	V	M	T	G	E!	L	P	F	-NH <sub>2</sub>		
<u>POLO</u>												
J42	Ac-		M	L	L	G	R	P	F	E!	-NH <sub>2</sub>	
J43	Ac-		M	L	L	G	K	P	F	NH <sub>2</sub>		
J43.1	Ac-		M	L	L	G	K	P	F	E!	-NH <sub>2</sub>	
J45				Ac-L	L	G	R	P	F	E!	T	S
J46	Ac-		M	L	L	G	R	P	F	E!	T	S
<u>AKT/PKB</u>												
J47				Ac-	G	R	L	P	F	N	-NH <sub>2</sub>	
J48	Ac-	E!	M	M	S	G	R	L	F	N	-NH <sub>2</sub>	
<u>GSK3</u>												
J29	Ac-	L	L	L	G	Q	P	I	F	P	G	-NH <sub>2</sub>

E! - グルタミン酸のベンジルエステル

Figure 4

【図5】

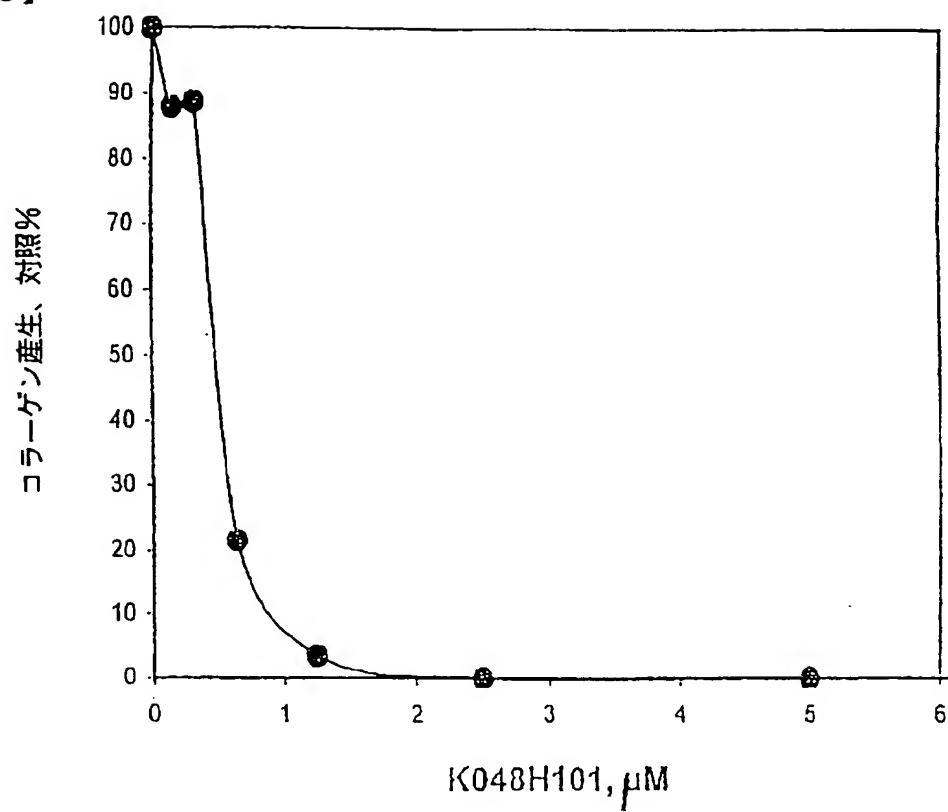


Figure 5



【図 6】

## アクチビン/TGFβR

ACTRIIA

ペプチドN_末端	C_末端
K085H101	NH2
ミリスチル・G	
G P V D E Y M L P F	

ALK1

ペプチドN_末端	C_末端
K048H101	NH2
ミリスチル・G	
G I V E D Y R P P F	

ALK3

ペプチドN_末端	C_末端
K088H101	NH2
ミリスチル・G	
G I V E E Y Q L P Y	

ALK4

ペプチドN_末端	C_末端
K099H101	NH2
ミリスチル・G	
G Q V H E E Y Q L P Y	

TGFβRII

ペプチドN_末端	C_末端
K093H101	NH2
ミリスチル・G	
G E V K D Y E P P F	

AKV/PKB

Akt1/Rac

ペプチドN_末端	C_末端
K014H101	NH2
ミリスチル・G	
M M S G R L P	

Figure 6A

【図6】

CAPK

cAPKa

ペプチドN_末端		C_末端
K004H001	アセチル M A A G Y P	NH2
K004H002	アセチル M A A G Y P P F F	NH2

CDK

CDK2

ペプチドN_末端		C_末端
K049H101	ミリスチル-G M V T R R A L F	NH2

CDK4

ペプチドN_末端		C_末端
K050H101	ミリスチル-G M F R R K P L F	NH2

CHK

Chk1

ペプチドN_末端		C_末端
K088H001	アセチル M L A G E I L P W D I	NH2
K088H101	ミリスチル-G M L A G E L L P	NH2
K088H103	ミリスチル-G M L A G E L	NH2
K088H104	ミリスチル-G M L A G E L P W D	NH2

Figure 6B

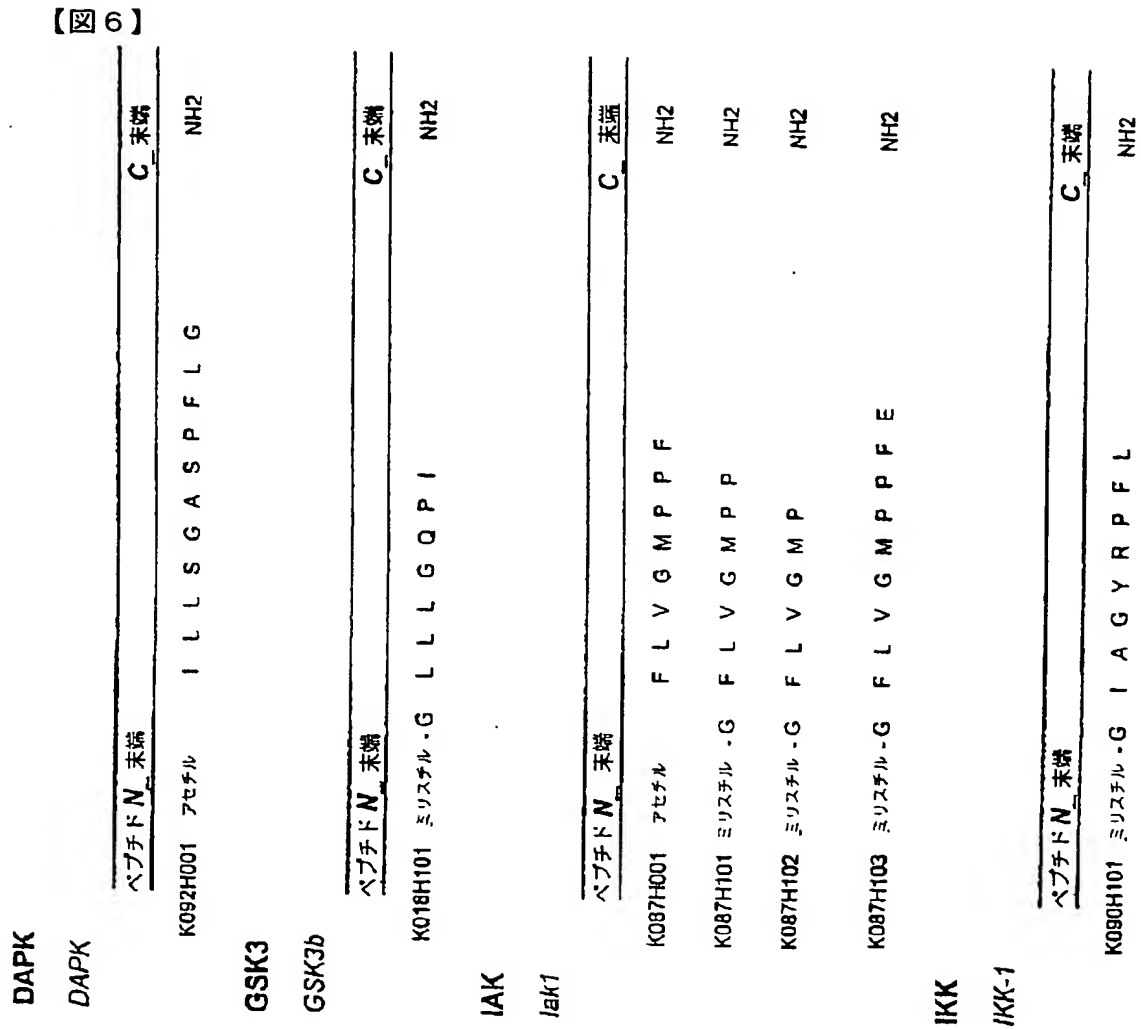


Figure 6C

【図 6】

IKK-2

ペプチド N 末端		C 末端
K091H001	アセチル I T G F R P F L	NH <sub>2</sub>
K091H101	ミリスチル - G I T G F R P F L	NH <sub>2</sub>

ILK

ILK

ペプチド N 末端		C 末端
K107H001	アセチル L V T R E I V	NH <sub>2</sub>
K107H101	ミリスチル - G L V T R E V P F	NH <sub>2</sub>
K107H102	ミリスチル - G L V T R E V	NH <sub>2</sub>

MARK/p78

MARK1

ペプチド N 末端		C 末端
K045H101	ミリスチル - G L V S G S	NH <sub>2</sub>
K045H102	ミリスチル - G L V S G S L P	NH <sub>2</sub>

Figure 6D

【図 6】

PKC

PKCb

ペプチド N 末端		C 末端
K008H001	アセチル M L A G Q A P F	NH2
K008H101	ミリスチル -G M L A G Q A P	NH2
K008H102	ミリスチル -G M L A G Q A	NH2
K008H103	ミリスチル -G M L A G Q A P F E	NH2

POLO

Plk

ペプチド N 末端		C 末端
K035H001	アセチル L L V G K P P F	NH2
K035H101	ミリスチル -G L L V G K P P	NH2

SNK

ペプチド N 末端		C 末端
K038H101	ミリスチル -G M L L G R P P F E I	NH2
K038H102	ミリスチル -G M L L G R P P	NH2

Figure 6E

【図6】

RAF	Bra1	
	ペプチドN <sub>1</sub> 末端	C <sub>1</sub> 末端
	K003H103    ミリスチル-G    L M T G Q L	NH2
	K003H104    ミリスチル-G    L M T G Q L P Y S	NH2
c-Raf	ペプチドN <sub>2</sub> 末端	
	C <sub>2</sub> 末端	
	K001H102    ミリスチル-G    L M T G E L	NH2
	K001H103    ミリスチル-G    L M T G E L P Y S	NH2

Figure 6P

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年7月27日(1999. 7. 27)

【補正内容】

上記のように、これらのペプチドのN末端および／またはC末端は改変され得る。図4に示されるように、これらのペプチドのN末端はアセチル化されており、そしてC末端はアミド化されている。上記のように、アミドおよびカルボン酸について他の保護基が使用され得る。必要に応じて、一方または両方の保護基が、除去され得る。ペプチドは、直鎖状または環状であり得る。

以下の配列を有するペプチドもまた、含まれる：HJ-38（配列番号：13）、J-41（配列番号：14）、J-42（配列番号：15）、J-43（配列番号：16）、J-43.1（配列番号：17）、J-45（配列番号：18）、J-46（配列番号：19）、J-47（配列番号：20）、J-48（配列番号：21）、およびJ-29（配列番号：22）。ただし、ペプチド中の任意の1つのアミノ残基は変化し得、任意の自然に存在するアミノ酸またはその類似体であり得る。本発明はまた、上記に列記した配列を有するペプチドを含む（ただし、ペプチド中の任意の2つのアミノ残基が変化し得て、任意の自然に存在するアミノ酸またはその類似体であり得る）。

本発明はまた、STKのHJループの改変された配列またはサブ配列に対応するアミノ酸配列を有する環状のペプチドを含む。そしてこれは、STKの活性を調節する。

「環状のペプチド」は、例えば、N末端の窒素原子とC末端のカルボニル炭素との間でのペプチド結合によって環が形成される、ペプチドまたはペプチド誘導体をいう。

「環化される」はまた、化合物のN末端の窒素と、ペプチド中の好適なアミノ酸（好ましくは、C末端のアミノ酸）の側鎖との間での共有結合によって環を形成することをいう。例えば、アミドは、N末端の窒素原子と、アスパラギン酸またはグルタミン酸の側鎖中のカルボニル炭素との間で形成され得る。あるいは、ペプチドまたはペプチド誘導体は、化合物のC末端のカルボニルと、ペプチド中

の好適なアミノ酸（好ましくは、N末端のアミノ酸）の側鎖との間で共有結合を

形成することによって環化され得る。例えば、アミドは、C末端のカルボニル炭素と、リジンまたはオルニチンの側鎖中のアミノ窒素原子との間で形成され得る；エステルは、C末端のカルボニル炭素と、セリンまたはトレオニンの側鎖中のヒドロキシ酸素原子との間で形成され得る。

表

ペプチド	SVR 細胞に ついてのS.I.* ( $\mu$ M)	MSI 細胞に ついてのS.I.* ( $\mu$ M)	A19 細胞に ついてのS.I.* ( $\mu$ M)
HJ38	10	10	試験せず
J41	試験せず	10	試験せず
J42	10	試験せず	10
J43	試験せず	試験せず	40

\*細胞増殖の有意な阻害が観察された濃度

表の結果から分かるように、Raf及びPoloのHJペプチド誘導体はウシ大動脈細胞並びに形質転換したマウス細胞株MS1及びSVRの細胞増殖を阻害した。

実施例3 — アクチビン/TGF $\beta$ R KO48H101（配列番号：24）のNHペプチド誘導体は胎児の肺の繊維芽細胞によるコラーゲン産生を阻害する細胞

胎児の肺の繊維芽細胞を0.5%FCSを含むDMEM培地に懸濁し、96ウェル平底組織培養プレートに1ウェル当たり50,000細胞の濃度（1ウェル

当たり45 $\mu$ l）で播種する。熱活性化されたTGF $\beta$ を含む条件の培地（MCF-7細胞から選択する）45 $\mu$ lの存在下及び試験したペプチドの増加する濃度（10 $\mu$ lのPBS+0.1%BSA+1%DMSF中に0～10 $\mu$ M）の非存在下又は存在下で、48時間インキュベートする。全容量は、1ウェル当たり100 $\mu$ lである。

可溶性コラーゲン

インキュベーション期間の終わりに、上澄みを取り除き、新しい組織培養プレート内に1ウェルアリコート当たり50 $\mu$ lで塗布する。プレートを37℃で2



4時間湿潤な雰囲気中でインキュベートし、次いで37℃で24時間乾燥してコラーゲンを付着させる。乾燥プレートを蒸留水で3回、1ウェル当たり200μlで1洗浄当たり1分間洗浄し、1ウェル当たり飽和したピクリン酸(w/v)中100μlの0.1%ダイレクトレッド(direct red)80で1時間室温中で染色する。過剰な染料を、10mMのHClで5回、1ウェル当たり200μlで1洗浄当たり10秒間ウェルを洗浄することによって除去する。コラーゲンと結合した染料を1ウェル当たり200μlの0.1M NaOHで溶出し、540nmで読む。

#### 細胞の計数

上澄みを除去した後、細胞を1ウェル当たり200μlの緩衝化ホルマリンで1時間室温で固定し、次いで1ウェル当たり200μlの0.1Mホウ酸緩衝液で洗浄する。固定した細胞を、1ウェル当たり50μlの1%メチレンブルーで15分間室温で染色する。過剰な染料を、水道水で洗浄する。細胞と結合した染料を1ウェル当たり200μlの0.1MのHClで溶出し、595nmで読む。コラーゲンを細胞ごとに表す。

KO48H101（配列番号：24）の結果を図5に示す。図5から分かるよ

うに、1μMのKO48H101のような低い濃度でほぼ完全なコラーゲン産生の阻害が起こる。約0.6μMのKO48H101の存在下で約80%の阻害が起こる。

コラーゲン産生の阻害は、例えば形成手術での、瘢痕形成の阻害及び癒着形成の阻害、腹部手術の重い合併症に対して有効であり得る。

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年8月27日（1999.8.27）

【補正内容】

#### 請求の範囲

1. セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体を含有するペプチドであって、

a) 該ペプチドが5個～約20個のアミノ酸またはアミノ酸類似体を有し、並びに

b) 該ペプチドがセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する、ペプチド。

2. ペプチドが環状である請求項1記載のペプチド。

3. ペプチドが直鎖状である請求項1記載のペプチド。

4. ペプチドのN末端及びC末端が置換されていない請求項3記載のペプチド。

5. N末端またはC末端の少なくとも1つが置換されている請求項3記載のペプチド。

6. N末端がアミド化され、C末端がアシル化されている請求項5記載のペプチド。

7. ペプチド誘導体が該セリン／トレオニンキナーゼの該HJループのアミノ酸配列の任意のサブ配列に対応するアミノ酸配列を有する請求項3記載のペプチド（ただし、ペプチド誘導体の配列中の任意の1または2個のアミノ酸は、1ま

たは2個の自然に存在するアミノ酸またはその類似体で置換されることにより、変化し得る）。

8. セリン／トレオニンキナーゼがp o l o、R a f、有糸分裂活性化プロテインキナーゼ（MAPキナーゼ）およびGタンパク質共役型受容体キナーゼからなるファミリーの群から選ばれる、セリン／トレオニンキナーゼファミリーのメンバーである請求項3記載のペプチド。

9. セリン／トレオニンキナーゼが、プロテインキナーゼC、サイクリックAMP依存性キナーゼ、カルモジュリン依存性キナーゼ、サイクリックGMP依存性プロテインキナーゼ、A k t／P K BおよびG S K 3からなる群より選ばれる、請求項3記載のペプチド。

10. セリン／トレオニンキナーゼがp o l oファミリーのメンバーであり、P l k、S n kおよびS a kからなる群より選ばれる、請求項8記載のペプチド。

11. セリン／トレオニンキナーゼがR a fファミリー由来であり、R a f-

1、A-R a f およびB-R a f からなる群より選ばれる、請求項8記載のペプチド。

12. セリン／トレオニンキナーゼが $\beta$ 2-アドルナリン受容体キナーゼ、ロドプシンキナーゼおよびGRK4～6からなる群より選ばれたGタンパク質依存性キナーゼである、請求項8記載のペプチド。

13. ペプチド誘導体が該HJループのアミノ酸配列のサブ配列に対応するア

ミノ酸配列を有する、請求項3記載のペプチド。

14. ペプチドがHJ-38（配列番号：13）、J-41（配列番号：14）、J-42（配列番号：15）、J-43（配列番号：16）、J-43.1（配列番号：17）、J-45（配列番号：18）、J-46（配列番号：19）、J-47（配列番号：20）、J-48（配列番号：21）またはJ-29（配列番号：22）の配列を有する、請求項3記載のペプチド。

15. HJ-38（配列番号：13）、J-41（配列番号：14）、J-42（配列番号：15）、J-43（配列番号：16\_\_）、J-43.1（配列番号：17）、J-45（配列番号：18）、J-46（配列番号：19）、J-47（配列番号：20）、J-48（配列番号：21）またはJ-29（配列番号：22）の配列を有するペプチド（ただし、そのペプチド中の任意の1または2個のアミノ酸残基は、1または2個の自然に存在するアミノ酸またはその類似体で置換されることにより、変化し得る）。

16. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

（ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選

ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はアラニン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はアラニン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はヒスチジン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>13</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステ

ル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、N-アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジノブタン酸からなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

該ペプチドは配列QIVAG、配列QVVAG、配列QIVAGC、配列ELPYAGおよび配列シクロ（ELPYAG）で表されない）。

17. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がRafのHJループの配列（配列番号：1）またはそのサブ配列に対応する、請求項16記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化した得る）。

18. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がRafのHJループの配列ま

たはそのサブ配列（配列番号：1）に対応する、請求項16記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化した得る）。

19. ペプチドが配列A<sub>1</sub>～A<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サ

ブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項17または18記載のペプチド。

20. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はアラニンまたはグリシンである；

AA<sub>5</sub>はアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はプロリンである；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>13</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルから

なる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪酸エステル、置換された脂肪酸エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はプロリンである；

AA<sub>16</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪酸エステル、置換された脂肪酸エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪酸エステル、置換された脂肪酸エステル、ベンジルエステル、置換

されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる）。

21. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がサイクリックAMP依存性キナーゼのHJループの配列（配列番号：2）またはそのサブ配列に対応する、請求項20記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

22. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がサイクリックAMP依存性キナーゼのHJループの配列またはそのサブ配列（配列番号：2）に対応する、請求項20記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

23. ペプチドが配列A<sub>1</sub>～A<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がA<sub>3</sub>～A<sub>10</sub>、A<sub>7</sub>～A<sub>14</sub>およびA<sub>11</sub>～A<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項21または22記載のペプチド。

24. アミノ酸A<sub>1</sub>～A<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、A<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

A<sub>2</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

A<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A<sub>5</sub>はシステイン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

A<sub>7</sub>はヒスチジン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

A<sub>8</sub>はプロリン、アラニンおよびセリンからなる群より選ばれる；

A<sub>9</sub>はプロリンである；

A<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

A<sub>11</sub>はヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された



脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>13</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置

換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>は、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はヒスチジン、グルタミン、グルタミン酸およびグルタミン酸の脂肪族

エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

該ペプチドはQ I V A GまたはQ V V A Gで表されない）。

25. 配列A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>またはそのサブ配列がプロテインキナーゼCのH J ループの配列（配列番号：3）またはそのサブ配列に対応する、請求項24記載のペプチド（ただし、配列A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはその

サブ配列は変化し得る）。

26. 配列A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>またはそのサブ配列がプロテインキナーゼCのH J ループの配列またはそのサブ配列（配列番号：3）に対応する、請求項24記載のペプチド（ただし、配列A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

27. ペプチドが配列A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がA A<sub>3</sub>～A A<sub>10</sub>、A A<sub>7</sub>～A A<sub>14</sub>およびA A<sub>11</sub>～A A<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項25または26記載のペプチド。

28. アミノ酸A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

（ここで、A A<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

A A<sub>2</sub>はリジンまたはオルニチンである；

A A<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A A<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

A A<sub>5</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアルギニン、アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジノブタン酸からなる群より選ばれる；

A A<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はヒスチジンである；

AA<sub>8</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアルギニン、アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジノブタン酸からなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>13</sub>はヒスチジンである；

AA<sub>14</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>15</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>16</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>17</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>19</sub>はヒスチジンである；ならびに

AA<sub>20</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる)。

29. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がbARK1.2のHJループ

の配列（配列番号：4）またはそのサブ配列に対応する、請求項28記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

30. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がbARK1.2のHJループの配列またはそのサブ配列（配列番号：4）に対応する、請求項28記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

31. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項29または30記載のペプチド。

32. アミノ酸AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

（ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はシステイン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、N-アミジノシトルリンおよび2-アミノ-4-グアニジノブタン酸(2-amino-4-guanidinobutanoic)からなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選

ばれる；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はアスパラギンまたはグルタミンである；

AA<sub>13</sub>はアルパラギンまたはグルタミンである；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸および脂肪族酸、置換された脂肪族酸、芳香族酸、置換された芳香族酸、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸のベンジルエステルまたは置換されたベンジルエステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はリジン、オルニチンおよびヒスチジンからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸および脂肪族酸、置換された脂肪族酸、芳香族酸、置換された芳香族酸、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸のベンジルエステルまたは置換されたベンジルエステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>17</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、N-アミジノシトルリン、2-アミノ-4-グアニジノブタン酸、リジンおよびオルニチンからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選

ばれる；

AA<sub>20</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸および脂肪族酸、置換された脂肪族酸、芳香族酸、置換された芳香族酸、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸のベンジルエステルまたは置換されたベンジルエステルからなる群より選ばれる)。

33. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がAkt/PKBのHJループの配列(配列番号:7)またはそのサブ配列に対応する、請求項32記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配

列は変化し得る)。

34. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がAkt/PKBのHJループの配列またはそのサブ配列(配列番号:7)に対応する、請求項32記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

35. ペプチドが配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>~AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>~AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>~AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項33または34記載のペプチド。

36. アミノ酸AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選

ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はグルタミン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はプロリンである；

AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選

ばれる；

AA<sub>12</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>13</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>14</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はヒスチジンである；

AA<sub>17</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、アミジノシトルリン、2-アミノ-4-グアニジノブタン酸リジンおよびオルニチンからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はリジン、オルニチン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置

換された芳香族エステルからなる群より選ばれる)。

37. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がカルモジュリン依存性キナーゼのHJループの配列(配列番号:5)またはそのサブ配列に対応する、請求項36記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

38. 配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がカルモジュリン依存性キナーゼのHJループの配列またはそのサブ配列(配列番号:5)に対応する、請求項36記載のペプチド(ただし、配列AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

39. ペプチドが配列A<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>~AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>~AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>~AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項37または38記載のペプチド。

40. アミノ酸AA<sub>1</sub>~AA<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、AA<sub>1</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>2</sub>はセリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>5</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>7</sub>はアルギニン、N-ニトロアルギニン、 $\beta$ -シクロアルギニン、 $\gamma$ -ヒドロキシアアルギニン、アミジノシトルリン、2-アミノ-4-グアニジノブタン酸リジンおよびオルニチンからなる群より選ばれる；

AA<sub>8</sub>はプロリンである；



AA<sub>9</sub>はプロリンである；

AA<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；

AA<sub>11</sub>はアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステ

ル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>12</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>13</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>14</sub>はシステイン、セリンおよびトレオニンからなる群より選ばれる；

AA<sub>15</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる；

AA<sub>16</sub>はリジンまたはオルニチンである；

AA<sub>17</sub>はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルからなる群より選ばれる；

AA<sub>18</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>19</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンからなる群より選ばれる；ならびに

AA<sub>20</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンからなる群より選ばれる)。

41. 配列 AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列が p o l o の H J ループの配列 (配列番号：6) またはそのサブ配列に対応する、請求項 40 記載のペプチド (ただし、配列 AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の 2 個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る)。

42. 配列 AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列が p o l o の H J ループの配列またはそのサブ配列 (配列番号：6) に対応する、請求項 40 記載のペプチド (

ただし、配列A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変  
化し得る)。

43. ペプチドが配列A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がA A<sub>3</sub>～A A<sub>10</sub>、A A<sub>7</sub>～A A<sub>14</sub>およびA A<sub>11</sub>～A A<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項41または42記載のペプチド。

44. アミノ酸残基A A<sub>1</sub>～A A<sub>20</sub>の配列または少なくとも5個のアミノ酸残基を含むそのサブ配列を含有するペプチド

(ここで、A A<sub>1</sub>はアラニンまたはグリシンである；

A A<sub>2</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸またはグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪酸エステル、置換された脂肪酸エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルである；

A A<sub>3</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

A A<sub>4</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

A A<sub>5</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

A A<sub>6</sub>はグリシンまたはアラニンである；

A A<sub>7</sub>はアスパラギンまたはグルタミンである；

A A<sub>8</sub>はプロリンである；

A A<sub>9</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

A A<sub>10</sub>はチロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンである；

A A<sub>11</sub>はプロリンである；

A A<sub>12</sub>はグリシンまたはアラニンである；

A A<sub>13</sub>はアスパラギン酸、グルタミン酸またはアスパラギン酸若しくはグルタミン酸の脂肪酸エステル、置換された脂肪酸エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルであ

る；

A A<sub>14</sub>はセリンまたはトレオニンである；

AA<sub>15</sub>はグリシンまたはアラニンである；

AA<sub>16</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；

AA<sub>17</sub>はグルタミン酸、アスパラギン酸またはグルタミン酸若しくはアスパラギン酸の脂肪族エステル、置換された脂肪族エステル、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、芳香族エステルまたは置換された芳香族エステルである；

AA<sub>18</sub>はアスパラギンまたはグルタメートである；

AA<sub>19</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである；ならびに

AA<sub>20</sub>はロイシン、イソロイシン、メチオニンまたはバリンである）。

45. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がGSK3のHJループの配列（配列番号：12）またはそのサブ配列に対応する、請求項44記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の2個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

46. 配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>またはそのサブ配列がGSK3のHJループの配列またはそのサブ配列（配列番号：12）に対応する、請求項44記載のペプチド（ただし、配列AA<sub>1</sub>～AA<sub>20</sub>中の任意の1個のアミノ酸またはそのサブ配列は変化し得る）。

47. ペプチドが配列A<sub>1</sub>～A<sub>20</sub>の8個のアミノ酸サブ配列を含有し、該サブ配列がAA<sub>3</sub>～AA<sub>10</sub>、AA<sub>7</sub>～AA<sub>14</sub>およびAA<sub>11</sub>～AA<sub>18</sub>からなる群より選ばれる請求項45または46記載のペプチド。

48. K095H1（配列番号：23）、K048H101（配列番号：24）、K098H101（配列番号：25）、K099H101（配列番号：26）、K093H101（配列番号：27）、K014H101（配列番号：28）、K004H001（配列番号：29）、K004H002（配列番号：30）、K049H101（配列番号：31）、K050H101（配列番号：32）、K088H001（配列番号：33）、K088H101（配列番号：34）、K088H103（配列番号：35）、K088H104（配列番号：36）、K092H001（配列番号：37）、K018H101（配列番号：38）、K087H001（配列番号：39）、K087H101（配列番号：40）、K087H102（配列番号：41）、K087H103（配列番号：42）、K090H101（配列番号：43）、K091H001（配列番号：44）

、K091H101（配列番号：45）、K107H001（配列番号：46）、K107H101（配列番号：47）、K107H102（配列番号：48）、K045H101（配列番号：49）、K045H102（配列番号：50）、K008H001（配列番号：51）、K008H101（配列番号：52）、K008H102（配列番号：53）、K008H103（配列番号：54）、K035H001（配列番号：55）、K035H101（配列番号：56）、K038H101（配列番号：57）、K038H102（配列番号：58）、K003H103（配列番号：59）、K003H104（配列番号：60）、K001H102（配列番号：61）、またはK001H103（配列番号：62）の配列を有するペプチド。

49. 下記工程：

- a) セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体を含み、5個～約20個のアミノ酸またはその類似体を有する、「試験ペプチド」と呼ばれるペプチドを提供する工程；
- b) セリン／トレオニンキナーゼの活性を評価するのに好適な条件下でそのセリン／トレオニンキナーゼにより制御される1以上の細胞活性を有する細胞と試験ペプチドをインキュベートする工程；
- c) セリン／トレオニンキナーゼの活性を評価する工程、ここで、試験ペプチドをインキュベートせずに培養した細胞と比較した場合により高いまたはより低い

活性が見られることは、該ペプチドがセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節することを示す、を含む、セリン／トレオニンキナーゼの活性を調節するペプチドを同定する方法。

50. セリン／トレオニンキナーゼの活性が組織培養中の該細胞の生存率または増殖率を測定することで評価される、請求項49記載の方法。

51. 治療有効量の、セリン／トレオニンキナーゼのHJループのペプチド誘導体を含むペプチドを投与する工程を含み、

- a) 該ペプチドが5個～約20個のアミノ酸またはアミノ酸類似体を有し；および
- b) 該ペプチドがセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する、被験体中のセリン／トレオニンキナーゼの活性を調節する方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N9/12 C1201/48 A61K38/45		International Application No. PCT/US 98/10319
According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GHISO J ET AL: "BINDING OF CYSTATIN C TO C4: THE IMPORTANCE OF SENSE-ANTISENSE PEPTIDES IN THEIR INTERACTION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 87, no. 4, 1 February 1990, pages 1288-1291, XP000103571 see page 1289, left-hand column, paragraph 2 --- -/--	16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 October 1998		Date of mailing of the international search report 19/11/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340 2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Van der Schaal, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Patent Application No  
 PCT/US 98/10319

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US Accession no 109:69322. OKADA, YOSHIO ET AL: "Synthesis of Gln-Val-Val-Ala-Gly, a common sequence of thiol proteinase inhibitors, and its derivatives. Relationship between structure and effect on thiol proteinases" XP002082498 see abstract & PEPT. CHEM. (1988), VOLUME DATE 1987 653-6 CODEN: PECHDP;ISSN: 0388-3698,1988, ---	16
A	HARDIE G. AND HANKS S.: "The protein kinase factsbook I" 1995, ACADEMIC PRESS, LONDON XP002082497 214500 cited in the application see page 7-20; figure 1 especially page 19 under Subdomain IX ---	
A	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US Accession no 120:100177, MCMURRAY, JOHN S. ET AL: "Cyclic peptide substrates of pp60c-src: synthesis and evaluation" XP002082499 see abstract & INT. J. PEPT. PROTEIN RES. (1993), 42(3), 209-15 CODEN: IJPPC3;ISSN: 0367-8377,1993, ---	2
A	WO 97 14038 A (TERRAPIN TECH INC) 17 April 1997 see the whole document -----	1,48,49

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 98/10319

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although claim(s) 50  
is(are) directed to a method of treatment of the human/animal  
body, the search has been carried out and based on the alleged  
effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such  
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
Please see Further Information sheet enclosed.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all  
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment  
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report  
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is  
restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US 98/10319

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The scope of claims 16 - 47 is very broad and speculative. A peptide sequence of which almost each of the 20 amino acids and the total length can vary independently, can not be considered to be a clear and concise definition of patentable subject matter. (Art.6 PCT). Furthermore the available experimental data actually only comprise a very small amount of the compounds claimed. Therefore claims 16 - 47 can not be considered to represent a permissible generalisation which is fairly based on experimental evidence, that is, they are not adequately supported by the description (Art.6 PCT). Therefore a meaningful and economically feasible search could not encompass the complete subject-matter of the claims. Consequently the search has been limited to the actually tested compounds (Art.17(2)(a)(ii)PCT, PCT Guidelines III,2.1) and thus is only complete for claim 14.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/10319

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9714038 A	17-04-1997	US 5783405 A	21-07-1998
		US 5776716 A	07-07-1998
		AU 7398696 A	30-04-1997

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	ターミナル (参考)
A 6 1 P	7/00	A 6 1 P	7/02
	7/02		9/04
	9/04		9/10
	9/10		
	1 0 1		1 0 1
	9/12		9/12
	11/06		11/06
	13/12		13/12
	17/06		17/06
	25/00		25/00
	25/16		25/16
	25/28		25/28
	29/00		29/00
	35/00		35/00
	37/04		37/04
	37/06		37/06
	43/00		43/00
	1 1 1		1 1 1
C 0 7 K	7/08	C 0 7 K	7/08
C 1 2 N	9/12	C 1 2 N	9/12
C 1 2 Q	1/48	C 1 2 Q	1/48
		A 6 1 K	37/52
			Z

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 ベンーサッソン, シュミュエル, エイ,  
イスラエル国 エルサレム 96555 エブ  
ステイン ストリート 3